

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Purificación y propiedades de una proteína (P8) con afinidad
por el DNA obtenida de fibroblastos en cultivo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Manuel Perucho Martínez

DIRECTOR:

José Salas

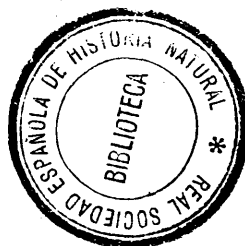
Madrid, 2015

5330828793

RSEHN-250

N

4513



PURIFICACION Y PROPIEDADES DE UNA PROTEINA (P8)
CON AFINIDAD POR EL DNA OBTENIDA DE FIBROBLASTOS
EN CULTIVO

Tesis presentada para optar al
grado de DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS por el licenciado
Manuel Perucho Martínez.

Madrid, Julio de 1976

Este trabajo, que se presenta como Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, ha sido realizado en el Departamento de Diferenciación Celular del Instituto de Biología del Desarrollo.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Salas, director de dicha tesis, así como a la Dra. María Luisa Salas, por la orientación y valiosas sugerencias que ambos me han prestado en la supervisión de este trabajo.

A los doctores Eladio Viñuela y Margarita Salas evidenciarles mi reconocimiento por la profunda influencia que han ejercido en mi formación en el campo de la Biología Molecular.

Así mismo, agradezco al profesor J.L. Rodríguez-Candela su amable acogida en el Departamento.

No puedo dejar de mostrar mi gratitud a todos mis compañeros y personal técnico por su inapreciable colaboración que ha hecho posible la realización de esta tesis, y especialmente al Dr. A. Pellicer, a C. Martín Piera y al Dr. J.A. Melero por sus sugerencias en la discusión de los problemas surgidos a lo largo de la labor experimental, y a M. Corral y L. Moore por la preparación de esta tesis.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca para la formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia, y a una beca de la Fundación Juan March.

ABREVIATURAS

P8: proteína 8

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

poli (dA-dT): ácido polidesoxiadenílico-desoxitimidílico (doble cadena)

poli A: ácido poliadenílico

ATP: adenosín trifosfato

DNasa: desoxirribonucleasa

RNasa: ribonucleasa

DMEM: medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

PBS: solución salina tamponada con fosfato

SSC: solución salina citrato

TL: tampón de lavado

TLSAB: tampón de lavado con seroalbúmina de bovino

SAB: seroalbúmina de bovino

TCA: ácido tricloroacético

SDS: dodecil sulfato sódico

NP40: nonidet P40

EDTA: etilén diamino tetraacetato

Tris: tri-hidroximetil-aminometano

TEMED: N,N,N'N'-tetrametiletilendiamina

Butil-PBD: 2-(4'-t-butilfenil)-5-(4"-bifenil)-1,3,4-
oxidiazol

PPO: 2,5-difenil-oxazol

dimetil POPOP: 1,4-bis 2(-metil-5-fenil-oxazolil)-
benceno.

cpm: cuentas por minuto

rpm: revoluciones por minuto

INDICE

Página

I. INTRODUCCION.....	1
A) Características del crecimiento de líneas celulares normales y transformadas por virus.....	3
1.- Control del crecimiento en líneas celulares esta- blecidas.....	5
2.- Transformación celular por virus oncogénicos.....	8
B) Interacción proteína-DNA.....	15
1.- Interacción proteína-DNA en organismos procarióticos.....	18
a) El represor de la lacto- sa de E. coli.....	18
b) El represor del bacteriófago lambda (λ).....	19

c) Proteína receptora de cAMP (CRP) de los opero- nes de la lactosa y galac- tosa de E. coli.....	24
d) Proteínas que facilitan la desnaturalización del DNA.....	25
2.- Interacciones proteína-DNA en organismos eucarióticos.....	31
a) Histonas.....	32
b) Proteínas no histonas cromosómicas.....	34
c) Proteínas con afinidad por DNA en líneas celu- lares en cultivo.....	39
II. MATERIALES.....	46
A) Líneas celulares.....	46
B) Medios de cultivo.....	46
C) Suero.....	47
D) Productos radiactivos.....	47
E) Enzimas.....	47
F) Proteínas utilizadas como marca- dores.....	48
G) Ácidos nucleicos.....	48

H) Otros productos químicos.....	49
I) Determinación de radiactividad.....	50
J) Placas de plástico para cultivo de células.....	50
K) Equipo.....	51
L) Soluciones tampón.....	53
III. METODOS.....	54
A) Cultivos celulares.....	54
1.- Medios de cultivo, soluciones y esterilización.....	54
2.- Mantenimiento de las líneas celulares y crecimiento en gran escala de las células.....	59
3.- Cultivos radiactivos.....	62
B) Purificación de la proteína 8 de NIL-HSV.....	64
1.- Preparación de las columnas de DNA-celulosa.....	64
a) DNA.....	64
b) Celulosa.....	64
c) Adsorción del DNA a la celulosa.....	65
d) Preparación de las columnas de DNA-celulosa.....	68

2.- Preparación de extractos celulares.....	68
3.- Cromatografía en columnas de DNA-celulosa.....	69
a) Cromatografía en columna de DNA (nativo)-celulosa.....	69
b) Cromatografía en columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa.....	70
4.- Cromatografía sobre fosfocelulosa.....	70
5.- Electroforesis en gel de poli-acrilamida.....	73
a) Preparación de las muestras....	73
b) Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	74
C) Propiedades fisicoquímicas de la proteína 8 de NIL-HSV.....	77
1.- Peso molecular en presencia de SDS.....	77
2.- Análisis de aminoácidos de la proteína 8.....	80
3.- Electroenfoque en gel de poli-acrilamida.....	81

4.-	Peso molecular de la proteína	
	8 en estado nativo.....	85
a)	Filtración en gel.....	85
b)	Ultracentrifugación ana- lítica. Equilibrio de se- dimentación de la P8.....	86
5.-	Método de tinción para glico- proteínas (PAS).....	90
D)	Interacción de la proteína 8 con el DNA.....	91
1.-	Unión de la proteína 8 purifi- cada a columnas de DNA-celulosa....	91
2.-	Interacción in vitro de la pro- teína 8 con el DNA: filtración por discos de nitrato de celu- losa.....	92
a)	Unión de la proteína 8 a DNA homólogo y heterólogo.....	93
b)	Efecto de la fuerza iónica y de la temperatura sobre la interacción in vitro de la P8 con el DNA desnaturali- zado.....	94

c)	Efecto de cationes divalentes sobre la interacción in vitro de la P8 con el DNA desnaturalizado de NIL-HSV.....	95
d)	Efecto del tamaño del DNA sobre la interacción P8-DNA desnaturalizado.....	95
e)	Curva de concentración de DNA desnaturalizado.....	96
f)	Unión de la proteína 8 a poli (dA-dT), poliA y RNA homólogo.....	97
3.-	Precipitación del complejo DNA (desnaturalizado)-P8.....	97
4.-	Estequiometría de la unión de la proteína 8 al DNA desnaturalizado.....	98
a)	Unión de la proteína 8 radiactiva a DNA desnaturalizado.....	99
b)	Unión de la proteína 8 fría a DNA desnaturalizado.....	99

5.- Preparación del DNA de NIL- HSV radioactivo.....	102
E) Ensayo de actividades enzimáticas.....	104
1.- Ensayo de RNasa.....	104
2.- Ensayo de DNasa (exonucleasa).....	105
3.- Ensayo de DNasa (endonucleasa).....	105
4.- Ensayo de ATPasa.....	106
F) Ensayo de unión a colchicina.....	107
IV. RESULTADOS.....	110
A) Purificación de la proteína 8 de celulas NIL-HSV.....	110
1.- Cantidad de proteína en los extractos crudos de NIL-HSV.....	110
2.- Cromatografía en columnas de DNA-celulosa.....	110
3.- Cromatografía en columna de fosfofelulosa.....	115
4.- Purificación de la proteína 8 a partir de cultivos radiac- tivos.....	118
B) Propiedades fisicoquímicas de la proteína 8 purificada.....	119
1.- Espectro de absorción ultra- violeta.....	119

2.- Peso molecular en presencia de SDS.....	119
3.- Peso molecular en estado na- tivo.....	120
4.- Composición de aminoácidos.....	121
5.- Punto isoeléctrico.....	122
6.- Tinción para glicoproteínas.....	123
7.- Electroforesis en gel de poli- acrilamida de la P8 en presencia de SDS con o sin mercaptoetanol....	123
C) Interacción de la proteína 8 con el DNA.....	125
1.- Unión a columnas de DNA-celu- losa de la P8 purificada.....	125
2.- Unión a DNA desnaturalizado homólogo.....	125
3.- Unión a DNA desnaturalizado heterólogo.....	127
4.- Efecto de la temperatura y la fuerza iónica en la inter- acción P8-DNA.....	127
5.- Cinética de formación del com- plejo P8-DNA desnaturalizado.....	128

Página

6.- Efecto de cationes divalentes sobre la interacción P8-DNA.....	129
7.- Curva de concentración de DNA.....	129
8.- Efecto del tamaño del DNA en la interacción con la P8.....	131
9.- Precipitación del complejo P8- DNA desnaturalizado.....	132
10.- Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA.....	133
11.- Interacción de la P8 con RNA, poli A y poli (dA-dT).....	138
D) Ensayo de actividades enzimáticas en preparados de P8 purificada.....	140
1.- Actividad RNasa.....	140
2.- Actividad DNasa.....	140
3.- Actividad ATPasa.....	143
E) Ensayo de fijación de colchicina por la P8 purificada.....	143
V. DISCUSION.....	145
IV. CONCLUSIONES.....	168
VI. BIBLIOGRAFIA.....	

INTRODUCCION

La diferenciación celular es el resultado de la interacción del genoma de las células con el medio ambiente o, dicho de otro modo, es un proceso de activación e inhibición génicas que está controlado por una gama de microambientes, que va desde la población celular al gen. Este proceso, que conduce a la diversidad de células especializadas en los organismos superiores, implica una transcripción selectiva de regiones diferentes del DNA cromosómico total, para producir las poblaciones de RNA características de los diferentes tipos celulares. Esta utilización del genoma, selectiva y parcial, ocurre a pesar del hecho de que todas las células somáticas procedentes de un mismo huevo contienen la misma dotación de genes, que en muchos casos es suficiente para especificar la formación de un organismo entero (1).

Está claro ahora que las células individuales suprimen la transcripción de gran parte de su DNA (2), mientras que activan selectivamente un número relativamente pequeño de genes necesarios para la síntesis, el ensamblaje, el procesamiento y las modificaciones postsintéticas de los enzimas y proteínas es-

estructurales característicos del tipo celular y de la especie. Esto es evidente al considerar la naturaleza limitada de sus RNA transcritos (2-4). En el curso del desarrollo embrionario y en el crecimiento, diferentes series de genes son activadas o reprimidas en respuesta a señales programadas procedentes del núcleo, del citoplasma, de la membrana celular y del medio ambiente.

El control de la división celular puede considerarse como un caso particular del fenómeno general de la diferenciación celular, de importancia básica para el estudio y comprensión de ésta. El ciclo celular de una célula eucariótica es una progresión ordenada e interdependiente de cambios biosintéticos y morfológicos que eventualmente culminan en la división celular. Las fluctuaciones sistemáticas en la actividad celular que ocurren a lo largo del ciclo celular son dependientes en último extremo de las variaciones de la actividad genética o transcripcional que pueden ocurrir como respuesta a cambios ambientales a niveles supra o subcelular (5-7).

La evolución de los organismos unicelulares a pluricelulares ha exigido, por otra parte, la apa-

rición de pautas muy precisas de control para la situación espacial y la velocidad de multiplicación de sus células diferenciadas. Una célula especializada determinada no crece en cualquier sitio en un organismo pluricelular, sino que está restringida a tener como entorno solamente ciertos tipos de células, y a proliferar sólo después de haber recibido una señal específica que indica que se necesitan más células de este tipo para el crecimiento ordenado o para el mantenimiento del organismo completo. Cualquier alteración en las rutas a lo largo de las cuales se transmiten esas señales, puede conducir a una de las muchas formas anormales de crecimiento que se conocen con el nombre colectivo de cancer. El cancer es pues, la propiedad de crecimiento descontrolada que da lugar a las masas localizadas de células de un solo tipo, llamadas tumores.

A) CARACTERISTICAS DEL CRECIMIENTO DE LINEAS CELULARES NORMALES Y TRANSFORMADAS POR VIRUS.

El uso de los cultivos de tejidos ha permitido un avance considerable en el estudio de la regulación de la multiplicación celular y del cancer, al ser posible crecer células normales y cancerosas fuera del

organismo, con la simplificación en la manipulación y en el control de las condiciones externas que esto lleva consigo. En ciertos casos, se han podido obtener cultivos constituidos por un sólo tipo de célula con un tiempo de generación constante y con capacidad de crecer indefinidamente in vitro, que se han denominado líneas celulares establecidas.

Debido a la facilidad de su manejo experimental, su potencialidad de crecimiento, y la posibilidad de sincronización y obtención de cantidades considerables de material, las líneas celulares establecidas se han utilizado como un modelo sencillo en el estudio de varios campos de la biología de animales superiores, tales como el cancer (8), la virología (9), la inmunología (10), la neurobiología (11), y la biología del ciclo celular. Este último ha sido abordado desde distintos puntos de vista : teórico (12), genético (13) y bioquímico. El análisis bioquímico del ciclo celular ha incluido estudios acerca del control de la síntesis de DNA (14,15), RNA (16) y proteína (17), de los cambios en las propiedades de la membrana celular (18) y de la regulación genética del proceso de la proliferación celular. A continuación describiremos brevemente las características del cre-

cimiento in vitro de las líneas celulares establecidas, tanto normales como transformadas por virus oncogénicos.

1.- Control del crecimiento en líneas celulares establecidas.

Los cultivos de líneas celulares establecidas, al contrario que los organismos unicelulares que crecen exponencialmente hasta que se agota algún componente nutritivo esencial del medio de cultivo, muestran ciertas formas de control del crecimiento : así, las células epiteliales o fibroblásticas crecen exponencialmente adhiriéndose al fondo de la placa de cultivo hasta que, al hacerse denso el cultivo, la velocidad de división disminuye, llegando a detenerse por completo en algunos casos. Esta inhibición coincide con un cambio de la morfología celular hacia formas más compactas, impuesto por el contacto entre las células. La inhibición del crecimiento no está causada por un agotamiento o modificación del medio de cultivo, ya que también ocurre si el medio se renueva continuamente (19). Por otra parte, dicha inhibición es reversible, ya que las células recuperan su máxima velocidad de división cuando se subcultivan a menores

densidades celulares (20, 21, 22).

Este fenómeno fue denominado originalmente por Todaro y Green (23) inhibición por contacto de la división celular y posteriormente Dulbecco (24) empleó el término de topoinhibición del crecimiento para designar el mismo fenómeno.

En un sentido más amplio, el fenómeno anteriormente descrito se ha denominado también inhibición del crecimiento dependiente de la densidad celular (25), o inhibición del ciclo celular (26).

Los estudios encaminados a establecer las causas de la inhibición del crecimiento dependiente de la densidad han dado lugar a cierta controversia acerca de la influencia relativa del contacto entre las células y de los factores del medio de cultivo. Está claro que la velocidad de división celular depende en gran medida de las condiciones del medio, que a su vez varían con el número de células y con el tiempo que permanece sin ser renovado. La división llega a inhibirse parcialmente a medida que se produce ácido láctico y el pH del medio de cultivo disminuye (27,28). Las células también producen otras sustancias inhibidoras

(29), y ciertas células producen factores que estimulan la división (30). De los ingredientes suministrados con el medio fresco, los factores estimuladores de la división mejor conocidos son ciertas macromoléculas del suero (31). La adición de suero fresco a un cultivo estacionario da lugar a una estimulación de la división celular. Una vez que las células han agotado los factores del suero, la velocidad de la división se reduce o cesa completamente hasta que se añade de nuevo suero fresco (32). Así mismo, distintas clases de hormonas, tales como la insulina (33) y los glucocorticoides (34) estimulan el crecimiento de células en cultivo, lo que sugiere que estas hormonas pueden jugar un papel regulador de la proliferación celular in vivo.

Por otra parte, el uso de cultivos de células a las que se renueva constantemente el medio de cultivo, ha permitido demostrar que el contacto intercelular es un determinante primario de la inhibición de la división celular en el caso de células de tipo epitelial, mientras que en células de tipo fibroblástico, el contacto y la formación de una monocapa celular influyen la toma de nutrientes del medio de cultivo,

inhibiendo de forma indirecta el crecimiento celular (19, 35, 36).

2.- Transformación celular por virus oncogénicos.

Ciertos virus animales que contienen DNA y RNA como material genético producen una conversión o transformación de las células normales en células que poseen nuevas propiedades, incluyendo un potencial neoplásico. Estas propiedades nuevas se transmiten hereditariamente de forma estable a todas las células de la progenie (37).

El mecanismo de la adquisición de algunas propiedades nuevas es simple, como la ganancia, por parte de células incapaces de producir timidina kinasa, de la información genética viral para la síntesis de este enzima (38). Otras consecuencias de la transformación son más complejas, como la conversión de una célula normal en otra con potencial oncogénico; en este caso, se modifican varias propiedades de la célula, se desarrolla un nuevo fenotipo, y se expresan ciertas funciones virales, confiriendo a la célula transformada una serie de características morfológicas, de crecimiento y bioquímicas que la diferencian

de la célula normal. Estas características se asemejan a las propiedades que manifiestan las células aisladas de tumores cuando se cultivan in vitro. Así mismo, el hecho de que las células transformadas sean capaces de inducir la formación de tumores cuando se inoculan en huéspedes adecuados (39), sugiere que la transformación celular in vitro por virus oncogénicos es un proceso similar al de la adquisición de la malignidad por las células de un organismo.

Las células transformadas en cultivo suelen crecer hasta densidades celulares muy altas, en unas condiciones en que el crecimiento de las células no transformadas correspondientes está limitado por el suministro de los factores macromoleculares del suero. Esto sugiere que las células transformadas presentan un menor requerimiento por los factores de crecimiento del suero (40). Por otro lado Todaro y Green encontraron que, aún en presencia de exceso de suero, las células no transformadas de la línea establecida de fibroblastos de ratón 3T3 cesaban de dividirse a baja densidad celular. Por el contrario, por infección con un virus tumoral como el SV40, aparecían colonias de células transformadas que continuaban

creciendo después de que las células habían formado una monocapa (41,42). En general, se ha observado que las células transformadas son menos sensibles a la topoinhibición del crecimiento que sus correspondientes células normales (24), por lo que alcanzan densidades de saturación más altas, y frecuentemente forman colonias densas y focos de células entrecruzadas y apiladas unas sobre las otras (37). Así mismo, las células transformadas muestran una mayor independencia con respecto al pH del medio de cultivo que las células normales, admitiendo una gama más amplia de valores de pH (27).

Los fibroblastos de cultivos primarios y las células de muchas líneas establecidas necesitan fijarse a una superficie sólida para poder crecer, y por lo tanto, no pueden dividirse cuando se suspenden en un medio líquido o en un gel de agar o metil-celulosa (43). Esta propiedad fue denominada por Stoker "multiplicación dependiente de anclaje" (44). Por el contrario, las células transformadas muestran una menor adherencia al fondo de la placa de cultivo, y no tienen un requerimiento tan absoluto de fijarse a un soporte sólido para crecer (45). En esta propiedad se basaron

MacPherson y Montaigner (46) para desarrollar un método selectivo de ensayo para la transformación de fibroblastos de la línea establecida BHK, por el virus del poliovirus. Este método utiliza la capacidad que tienen las células transformadas de crecer en agar blando. Las células que forman colonias en la capa de agar presentan las propiedades de células transformadas : poseen antígenos virales, crecen hasta altas densidades de saturación, tienen un requerimiento reducido de suero y forman tumores cuando se inyectan en animales apropiados.

En relación con esta propiedad de las células transformadas, cabe mencionar que los fibroblastos en cultivo poseen una especie de esqueleto interno en el citoplasma, formado por una estructura compleja de haces de fibras que confieren rigidez a la célula, permitiendo su anclaje al sustrato, y que, al mismo tiempo, juegan un papel importante en la motilidad celular (47). Recientemente, mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia, se ha encontrado que las fibras que componen esta estructura están formadas por tubulina, actina, miosina y otras proteínas contráctiles (47,48,49). Al mismo tiempo se ha observado que

las células transformadas presentan un patrón distinto en la estructura de este esqueleto, que es mucho más difuso que el de las células normales, lo cual podría relacionarse con su menor capacidad de adherencia al fondo de la placa (50,51).

En opinión de muchos investigadores la membrana plasmática puede desempeñar un papel esencial en el reconocimiento célula-célula y en el control del crecimiento celular. Esto es evidente si tenemos en cuenta que cualquier agente externo que estimula o inhibe la división celular (factores del suero, nutrientes, inhibición por contacto, etc), debe necesariamente interaccionar como primera condición con la membrana celular. Esto ha determinado que sea dicha membrana la primera estructura subcelular sometida a un estudio comparativo exhaustivo a nivel bioquímico y estructural en células normales y transformadas.

De esta manera se ha demostrado la importancia de las proteínas de la membrana en el reconocimiento célula-célula y en la inhibición por contacto del crecimiento celular. Así, se ha encontrado una glicoproteína de alto peso molecular en la membrana de células normales, que se halla expuesta al medio externo,

pero que no se detecta en células transformadas (52). Un tratamiento suave con tripsina destruye esta proteína y estimula a su vez el crecimiento de las células normales.

Por otra parte, un estudio comparativo de la aglutinación de ambos tipos de células por distintas clases de lectinas (aglutininas), ha permitido observar que las células transformadas son mucho más sensibles a las aglutininas que las células no transformadas (53,54), y que éstas son más fácilmente aglutinadas durante la mitosis que en la interfase, mientras que las transformadas presentan una mayor aglutinabilidad durante la interfase (55). Se vió, sin embargo, que ambas clases de células fijan la misma cantidad de lectinas, pero en las células transformadas estas moléculas se encuentran agrupadas en pequeñas zonas de la membrana celular, mientras que en las normales están distribuídas uniformemente por toda la membrana plasmática (56).

Por otro lado, se ha visto también que ciertos antígenos específicos de virus están presentes en la membrana de las células transformadas, al mismo tiempo que se produce un desenmascaramiento de antígenos

embrionarios en la superficie celular (37).

En la tabla A se resumen las modificaciones inducidas por virus que forman parte del fenotipo de las células transformadas.

TABLA A. Propiedades fenotípicas de las células transformadas por virus.

- Conversión morfológica
 - Densidad de saturación aumentada
 - Crecimiento en medio agotado
 - Crecimiento en agar blando
 - Mayor aglutinabilidad por lectinas vegetales
 - Síntesis de nuevos antígenos
 - Síntesis de RNA específico del virus
 - Síntesis de nuevos enzimas
 - Inmortalidad
 - Oncogenia
-

A pesar de todos los cambios que han sido detectados en las células transformadas por virus, no se tiene todavía una idea clara de los mecanismos por los cuales el virus modifica la expresión de tantas propiedades celulares. Hasta ahora no ha sido aislada una posible "proteína transformante" codificada por el virus, que cause por sí sola la conversión de una célula normal en una célula transformada. En 1972, Levine y Burger (57) postularon un mecanismo para explicar el mantenimiento del estado transformado por los virus DNA, SV40 y poliovirus. Esta hipótesis sugiere que los virus DNA codifican una proteína que causaría la iniciación de la síntesis del DNA celular en un lugar diferente del punto normal de iniciación. De esta forma, la síntesis del DNA celular estaría desfasada, lo cual podría modificar los mecanismos normales de control de la síntesis de RNA mensajero y de proteína.

B) INTERACCION PROTEINA-DNA.

Hasta aquí, hemos resumido las características del crecimiento de las líneas celulares establecidas

y los factores que controlan la división celular, así como las alteraciones que presentan las células transformadas en los mecanismos de control. De lo dicho anteriormente, parece claro que hay una serie de factores externos e internos que regulan el crecimiento celular. Tanto la replicación del DNA, como la transcripción selectiva del mismo, dependen en último extremo de mecanismos dinámicos complejos que implican la participación de proteínas relacionadas con el metabolismo del DNA, ya sean proteínas con actividades enzimáticas (DNA-Polimerasas, RNA-Polimerasas, etc) o proteínas reguladoras que modulan la actividad de esos enzimas. Muchas de estas proteínas ejercen su función reguladora a través de una interacción más o menos específica con ciertas secuencias del DNA. En los casos documentados hasta la fecha, ha quedado bien establecido que las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos controlan la expresión organizada del genoma en el metabolismo celular, la división y el desarrollo (58).

Desde un punto de vista funcional, las proteínas que interaccionan con el DNA pueden dividirse en aquellas que facilitan la transferencia de información y aquellas que la inhiben (el término transferencia de in-

formación se utiliza en un sentido general que incluye no solamente la transcripción, sino también la transferencia de información de DNA a DNA, como en la replicación y en la recombinación). Ambas clases funcionales de proteínas pueden ser subdivididas en aquellas que interaccionan con secuencias específicas de nucleótidos y las que interaccionan con el DNA de una forma no específica de secuencia. Como ejemplos de proteínas que facilitan la transferencia de información, se puede citar el comportamiento en la iniciación de la transcripción del complejo RNA-Polimerasa-promotor, como un prototipo de la subclase específica de secuencia, mientras que la proteína del gen 32 del fago T4 puede tomarse como representativa del grupo no específico de secuencia. El represor de la lactosa de Escherichia coli proporciona un ejemplo excelente de una proteína específica de secuencia que inhibe la transferencia de información, mientras que las histonas y protaminas de las células eucarióticas sirven para ilustrar la subclase de proteínas inhibidoras de la transferencia de información no específica de secuencia (58).

A continuación resumiremos brevemente los casos mejor estudiados de la interacción de proteínas con el DNA en organismos procarióticos, y a continuación pasaremos a estudiar el problema de dicha interacción en las células eucarióticas.

1.- Interacción proteína-DNA en organismos procarióticos.

a) El represor de la lactosa de E. coli

El represor de la lactosa (lac) de Escherichia coli es una de las primeras proteínas con afinidad por el DNA que ha sido posible estudiar detalladamente desde el punto de vista genético y bioquímico. La proteína (producto del gen i) regula la expresión del operón de la lactosa en un sitio del cromosoma bacteriano llamado el operador lac (59). El represor se une al operador con gran especificidad (60), y esta interacción impide la transcripción del RNA mensajero. La desrepresión ocurre como resultado de un cambio conformacional en el represor debido a la unión de una molécula inductora de bajo peso molecular (galactósido).

El represor de la lactosa es un tetrámero estable constituido por subunidades idénticas con un peso molecular de 38.000 (61). Las dos actividades de la proteína, la actividad de unión al operador y la de unión al inductor, se pueden separar, ya que se conocen mutaciones (i^S) en las cuales el represor conserva su afinidad por el operador, pero pierde gran parte de

su afinidad por el inductor (62), y por otro lado, existen mutaciones (i^{-d}) que no afectan las propiedades del represor de unión al inductor, pero eliminan su unión al operador (63).

La reacción de unión al operador es específica para DNA de doble cadena (64), y es debida probablemente a una atracción electrostática entre la zona de la proteína cargada positivamente (región amino terminal) (65) y los grupos cargados negativamente del operador, lo cual podría explicar la disminución en la estabilidad del complejo a fuerzas iónicas altas (61).

Por estudios cinéticos de la interacción represor-operador por la técnica de filtración por discos de nitrato de celulosa se ha demostrado que la constante de afinidad es muy dependiente de la fuerza iónica, pasando de 10^{-13} M a ClK 0,02 M a valores inferiores a 10^{-11} M a ClK 0,2 M (61). La constante de afinidad parece ser relativamente insensible a los cambios de pH (entre 6,5 y 8), y la temperatura (66).

b) El represor del bacteriófago lambda (λ).

El análisis genético del fago λ ha revelado la existencia de una serie de controles relacionados entre sí para

la expresión del genoma del fago, tanto en los estados lítico como lisogénico (67).

El represor del fago λ , un producto del gen cI , es el elemento regulador que mantiene la represión del DNA viral en el estado lisogénico (68). Dos operadores son reconocidos por la misma proteína. Estos operadores están situados en una región pequeña del DNA (región de inmunidad o imm), con una longitud de unos 3.000 pares de bases. Cada operador regula independientemente la transcripción de un operón situado a cada lado del gen cI . El represor unido al operador izquierdo (O_L) bloquea la transcripción del gen N , y el unido al operador derecho (O_R) bloquea la transcripción del gen tof. Por otro lado, se ha descubierto recientemente que el operador de la derecha (O_R) tiene tres sitios de unión al represor, con afinidades decrecientes, lo cual ha permitido explicar la manera en que el represor controla su propia síntesis : La RNA-polimerasa reconoce dos sitios de unión al DNA (promotores) en la región del operador (O_R). Al moverse hacia la derecha desde uno de los promotores, la polimerasa transcribe el gen tof. Al moverse hacia la izquierda desde el otro promotor la polimerasa transcribe el gen cI que, como hemos dicho, codifica la síntesis del represor. Por análisis de los efectos de muta-

ciones en el operador O_R , se ha deducido que el represor de λ bloquea la transcripción del gen cI uniéndose a la tercera región del operador (O_{R3}), la de menor afinidad por el represor (69). De esta forma, al aumentar la concentración intracelular de represor, llega a bloquearse la transcripción del gen cI , por lo que los niveles de represor se mantienen más o menos constantes, suficientes para inhibir la transcripción de los genes N y tof, pero no para agotar la cantidad de represor, mecanismo por el cual se mantiene el estado integrado (lisogénico) del DNA del fago en el cromosoma bacteriano.

El represor reconoce estos operadores de una manera altamente específica, y se une a ellos con mucha mayor afinidad que a otras secuencias del DNA de lambda o de E. coli. Oligómeros del represor, probablemente dímeros, se unen al operador en una forma compleja. La naturaleza de la unión ha sido estudiada analizando los fragmentos de DNA de λ protegidos por el represor de la digestión por nucleasas (70). A medida que se incrementa la relación represor-operador, la longitud del fragmento de DNA protegido aumenta desde 35 a 100 pares de bases.

Un mecanismo molecular consistente con estos resultados sería el siguiente : el dímero del represor se uniría a un sitio determinado dentro de cada operador, y a continuación los monómeros se colocarían en sitios adyacentes, ocupando cada uno 15 pares de bases aproximadamente.

El represor de fago λ interacciona con DNA de doble cadena, y es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de 27.000, que, dependiendo de la concentración de proteína, se asocia formando oligómeros (dímeros y tetrámeros) (71).

Las curvas de unión del represor al DNA de λ , determinadas por el método de filtración por discos de nitrocelulosa, al contrario que las del represor de la lactosa, presentan una forma sigmoide; esto es, la unión del complejo represor-DNA al filtro a concentraciones bajas de represor es menos efectiva por unidad de proteína, que a concentraciones altas (72). Esta forma sigmoide no se debe a la existencia de dos operadores en el DNA (ya que con un DNA que por selección genética solo presenta un operador, la curva sigue siendo sigmoide), ni tampoco a una inactivación

del represor como consecuencia de la dilución en la mezcla de reacción (ya que al añadir represor frío a una mezcla de reacción, que contiene represor radiactivo a concentraciones bajas que no se une al DNA, las moléculas radiactivas del represor se recuperan ligadas al DNA por centrifugación en gradientes de sacarosa) (72). Chadwick et al concluyeron que la forma sigmoide reflejaba una unión cooperativa del represor al operador, y que la forma activa del represor es un oligómero, concretamente un dímero. La constante de afinidad de la unión represor-operador es del orden de 10^{-14} M en un tampón con ClK 0,05 M, pH 7, y a 20°C, aumentando un orden de magnitud a ClK 0,15 M. La constante de afinidad también aumenta unas 10 veces por cada incremento de 0,5 unidades de pH entre 6,5 y 8,5 y la vida media del complejo represor-operador es fuertemente dependiente de la temperatura, aumentando unas 20 veces cuando se disminuye la temperatura desde 20 a 0°C (71,72).

Tanto en el caso del represor de la lactosa, como en el del represor de lambda, las características fisicoquímicas más relevantes del complejo represor-operador son la extrema especificidad de la unión, la gran afinidad entre los componentes del complejo y las

constantes de asociación-disociación considerablemente altas observadas en la interacción.

- c) Proteína receptora de cAMP (CRP) de los operones de la lactosa y galactosa de E. coli.

Los represores de la lactosa y de lambda, que acabamos de describir, son ejemplos de control genético negativo. Los organismos procarióticos también utilizan proteínas con afinidad por el DNA para facilitar la transcripción, como ha demostrado el estudio de los mecanismos de activación de los operones de la lactosa (lac) y de la galactosa (gal) en Escherichia coli.

La inducción de la transcripción del operón de la galactosa requiere la interacción de éste con una proteína específica que ha sido llamada proteína receptora de AMP cíclico (CRP) (73), o proteína activada por catabolito (CAP) (74). Esta proteína es básica, con un punto isoeléctrico de 9,12 y tiene un peso molecular de unos 45.000, estando constituida por dos subunidades aparentemente idénticas de peso molecular 22.500 (75).

La CRP necesita la presencia de cAMP para estimular la transcripción. La unión de cAMP al receptor implica solamente un sitio por molécula de proteína, y

el complejo es esencial para la iniciación correcta de la transcripción de ambos operones, gal y lac.

Una cepa mutante de E. coli, defectiva en la proteína CRP, no hace RNA mensajero del operón lac, a pesar de la adición de cAMP exógeno (76).

La estimulación producida por la CRP en la iniciación de la transcripción de los operones gal y lac se ha atribuido a la unión de la proteína al DNA en las regiones de los promotores de ambos operones (77). La CRP no actúa por desplazamiento de la subunidad sigma de la RNA-Polimerasa bacteriana, que sigue siendo esencial para la iniciación correcta y la transcripción asimétrica por el enzima.

d) Proteínas que facilitan la desnaturalización del DNA.

La organización del material genético en la forma de doble hélice estable supone una serie de obstáculos para la replicación del DNA y para la recombinación genética. Investigaciones recientes sugieren que los mecanismos fisiológicos relacionados con la desnaturalización del DNA que facilitarían dichos procesos, implican una disminución de la estabilidad de la doble hélice, por unión de proteínas específicas para DNA de una sola banda.

La primera proteína de esta clase que se aisló, la proteína del gen 32 del fago T4, posee la capacidad de disminuir la temperatura de fusión del DNA y esta capacidad está relacionada con su papel in vivo. El producto del gen 32 del fago T4 es necesario en la replicación del DNA (78) y en la recombinación genética (79). Actúa en cantidades estequiométricas y no en cantidades catalíticas, y es necesaria a lo largo del ciclo de infección (80).

Alberts y colaboradores (81) aislaron la "proteína 32" de extractos de E. coli infectados con el fago T4, usando el método de cromatografía sobre DNA-celulosa y elución con concentraciones crecientes de ClNa. La proteína 32 se eluye de la columna con ClNa 2 M. Se estima que cada célula contiene unas 10.000 moléculas (unas 170 moléculas por punto de replicación del DNA). La proteína tiene un peso molecular de 35.000 y consta de una sola cadena polipeptídica, presentando una carga negativa a pH 7 (82). La proteína se une a DNA de una sola banda, poli dA, poli dI, y poli dT, pero no a DNA de doble banda o a RNA del fago R17 (83). Por titulación de la proteína con DNA desnaturalizado de T4, y medida de la proteína no unida, por sedimen-

tación en gradiente de sacarosa, los niveles de saturación calculados son de una molécula de proteína por cada 12 nucleótidos (82).

Una de las características más interesantes de la "proteína 32" es su unión cooperativa a DNA de una banda (82,83). De esta forma, a concentraciones de sal a la cuales una concentración baja de proteína no da lugar a unión al DNA, la adición de proteína puede conducir a un aumento en dicha unión. Con DNA en exceso, la proteína satura unas moléculas de DNA, mientras que otras moléculas quedan libres de proteína (84). La constante de asociación de una proteína a un sitio "contiguo" en el DNA se ha calculado que es al menos ochenta veces mayor que la constante de asociación para un sitio "aislado".

Como cabe esperar de su unión preferencial a DNA de una banda, la proteína del gen 32 disminuye la temperatura de fusión del DNA. Por ejemplo, en presencia de proteína 32, el poli(dA-dT) alcanza un 50% de desnaturalización en aproximadamente 20 minutos a 25°C, unos 40°C por debajo de la temperatura de fusión de este polímero (82). Por otra parte, la proteína 32 aumenta la velocidad de renaturalización del

DNA de T4 unas 1000 veces. Este efecto catalítico se atribuye a la fusión inducida por la proteína de las pequeñas zonas de doble banda presentes en el DNA desnaturalizado, cuya presencia entorpece en grado considerable el proceso de reanillamiento (82).

Alberts y Frey (82) han postulado que "el requerimiento de la proteína 32 en las etapas tempranas de la recombinación genética podría explicarse por su capacidad de abrir regiones locales del DNA nativo, facilitando simultáneamente la formación de la hélice entre las bandas emparejadas complementarias". Además, "los resultados genéticos que indican un papel estructural para la proteína 32 en la replicación del DNA sugieren que, desnaturalizaciones por la proteína 32 deben necesitarse en la horquilla de replicación". La proteína 32 estimula unas 5-10 veces la síntesis de DNA por la DNA-Polimerasa de T4 utilizando DNA de una banda como templado (85). Esta estimulación es mayor en condiciones que favorecen la presencia de "bucles" nativos en los moldes desnaturalizados (baja temperatura, alta fuerza iónica). En contraste, la DNA-Polimerasa de E. coli, que es capaz de replicar a través de zonas de doble banda, no es estimulada por la proteína del gen 32.

Una proteína que en ciertos aspectos se asemeja a la proteína del gen 32 del fago T4 ha sido aislada de extractos de E. coli infectados con el fago de tipo filamentoso fd (86). Este virus contiene DNA de una sola banda en su forma madura. La proteína, codificada por el gen 5 del fago, es esencial para la síntesis de DNA viral de una banda, a partir de templates de doble banda (formas replicativas). Hay unas 2×10^5 moléculas de esta proteína por célula. La proteína tiene un peso molecular de 10.000, muestra una carga neta positiva a pH neutro, y se une a DNA de una banda, pero no a DNA de doble banda. La saturación en la unión corresponde a una molécula de proteína por cada cuatro nucleótidos (87). Como la proteína 32, la proteína del gen 5 del fago fd se une cooperativamente al DNA de una banda, siendo la afinidad por un sitio "contiguo" unas 60 veces mayor que la afinidad por un sitio "aislado" (88). La proteína del gen 5 reduce la temperatura de fusión de varios DNAs en unos 40°C (87).

Se ha sugerido que la proteína del gen 5 actúa como un inhibidor de la síntesis de cadenas complementarias, permitiendo la acumulación de DNA viral de una sola banda durante los estadios tardíos del ciclo in-

feccioso, lo que facilitaría la subsiguiente encapsulación del DNA (89).

Una proteína similar ha sido purificada de extractos de E. coli. La proteína es un tetrámero asimétrico constituido por subunidades de 18.500 daltones, que se une cooperativamente a DNA de una sola banda en una relación de una molécula de proteína por cada 32 nucleótidos (90,91,92). La unión al DNA es completa en menos de 10 segundos a 0°C, mientras que la disociación de la proteína del DNA desnaturizado es relativamente baja aún a 37°C. Hay unas 300 copias de proteína por célula, cantidad suficiente para cubrir longitudes considerables de DNA en varias horquillas de replicación (92).

Como la proteína del gen 32 del fago T4, la proteína de E. coli disminuye la estabilidad del DNA de doble banda, reduciendo la temperatura de fusión del mismo actuando preferencialmente en zonas ricas en pares de bases A-T (90). La proteína desnaturizante de E. coli es un componente necesario junto con las DNA-Polimerasas II y III de E. coli, de sistemas in vitro de síntesis de DNA que utilizan DNA de una sola banda como templados (93,94). La proteína juega

aparentemente un papel limitando y dirigiendo la iniciación, así como estimulando la velocidad de síntesis del DNA.

2.- Interacciones proteína-DNA en organismos eucarióticos.

Debido a la complejidad de la organización del genoma en las células nucleadas (eucarióticas), hasta ahora no ha sido posible encontrar proteínas y mecanismos reguladores análogos a los ejemplos descritos anteriormente (represor de la lactosa, represor del fago lambda, proteína CRP). En contraste con el cromosoma bacteriano, compuesto esencialmente de DNA, el cromosoma eucariótico es una estructura compleja llamada cromatina, que además de DNA, contiene gran cantidad de proteína (histonas y no histonas) y pequeñas cantidades de RNA. Los polipéptidos que componen las histonas contienen cantidades considerables de los aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina, en contraste con las proteínas no histonas, que en general tienen carácter ácido. Muy poco se conoce sobre el papel funcional desempeñado por estos componentes de la cromatina, pero evidencia reciente sugiere que las moléculas responsables de la regulación gené-

tica específica pueden encontrarse entre las proteínas cromosómicas.

a) Histonas.

En 1943, Stedman y Stedman (95) dedujeron, de las cantidades aparentes de histonas en tejidos en crecimiento y en reposo, que estas proteínas podrían funcionar como represores biológicos. Sin embargo, los primeros estudios bioquímicos definitivos sobre el efecto de las histonas en la función del DNA fueron realizados al comienzo de la década de 1960 por Huang y Bonner (96) y Allfrey et al (97). En estos estudios se demostró que las histonas inhibían la capacidad del DNA para servir como moldes en la síntesis de RNA. Estos hallazgos, que fueron confirmados en una variedad de sistemas, condujeron a la especulación de que las histonas servían como represores específicos de la transcripción en una forma análoga a los represores bacterianos.

Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el número y la complejidad de las histonas eran demasiado limitados para dar cuenta de los aspectos altamente específicos y múltiples del control genético transcripcional que debe tener lugar en todos los

cromosomas de las células diferenciadas. Las histonas, con pocas excepciones, no son específicas de tejido; son considerablemente uniformes en su distribución, proporción relativa y composición en células de tipo muy diferente y muestran una estabilidad evolutiva extraordinaria (98). Actualmente se considera que su papel es fundamentalmente estructural. Su síntesis está acoplada a la del DNA (99) y su metabolismo en células en interfase está relacionado en gran medida con las modificaciones postsintéticas de estructura y carga que modulan su interacción con el DNA (100).

Recientemente, mediante técnicas de microscopía electrónica (101,102) y por digestión controlada por nucleasas (103,104), se ha podido comprobar que la cromatina presenta una estructura compuesta por subunidades globulares de unos 100 Å de diámetro, distribuidas longitudinalmente y repetidas cada 200 pares de nucleótidos, que se han llamado "nucleosomas" (105). Estas subunidades parecen estar formadas por la asociación de un par de cada una de las cuatro histonas (excepto la H1), unidas entre sí por las regiones no polares de sus cadenas polipeptídicas. El DNA se distribuye alrededor de estas subunidades, quedando

protegido de la acción de las nucleasas, y adquiriendo una conformación compacta, al aparecer varios puntos de distorsión en la doble hélice que le permite un grado considerable de superenrollamiento (106, 107).

b) Proteínas no histonas cromosómicas.

Puesto que no parece probable que las histonas puedan dar cuenta de la regulación genética específica en eucarióticos, se centró la atención en otra clase de proteínas presentes en la cromatina, las denominadas proteínas ácidas, o en un sentido más general, proteínas no histonas cromosómicas. Paul y Gilmour (108) demostraron que estas proteínas juegan un papel en la transcripción específica de tejidos. Utilizando técnicas de reconstitución de la cromatina, y análisis por hibridación de RNA transcrito con el DNA, estos investigadores establecieron que las proteínas no histonas cromosómicas interaccionan con el DNA y modifican la transcripción en una forma característica del tejido de origen. En contraste con las histonas, que están presentes en cantidades similares en tejidos activos e inactivos, las proteínas no histonas cromosómicas, se encuentran aumentadas en la cromatina

de tejidos activos (109). Por otro lado, las proteínas no histonas de la cromatina son altamente heterogéneas (110), poseen especificidad de especie (111) y de tejido (112), y pueden estimular la síntesis de RNA en sistemas in vitro (113). Algunas de ellas se unen específicamente al DNA (114, 115), y la síntesis de ciertas clases particulares de estas proteínas está asociada con la inducción de la actividad genética producida por agentes tales como cortisol (116), estradiol (117) y glucagón (118). También se observa un incremento en la síntesis de estas proteínas cuando se estimula la proliferación de las glándulas salivares de roedores por isoproterenol (119) o la de los linfocitos por la fitohemaglutinina (120) y la concanavalina A (121), o bien cuando se estimula la división de fibroblastos de la línea primaria W1-38 por un cambio de medio (122). La transformación de células W1-38 por el virus SV40 también conduce a una alteración detectable inmunológicamente en las proteínas no histonas cromosómicas (123).

Además, la naturaleza y la cantidad de las proteínas no histonas cromosómicas varía durante la embriogénesis (124), durante la diferenciación de ciertos tipos celulares particulares (125) y en diferentes

estados del ciclo vital de organismos en desarrollo (126).

Todos estos datos sugieren que las proteínas no histonas cromosómicas están implicadas en la regulación hormonal y en el control transcripcional de la actividad génica, y aunque se sabe poco acerca de la manera específica en que estas proteínas ejercen su función, se puede especular que las proteínas no histonas cromosómicas regulan la actividad genética mediante una interacción específica con el DNA o con las histonas, o bien con ambos. Debido a su naturaleza generalmente ácida, las proteínas no histonas, en contraste con las histonas, no participan probablemente en interacciones iónicas fuertes con los grupos fosfato del DNA, y parece más lógico suponer que pueden estar implicadas en el reconocimiento de secuencias específicas de bases. Además, se está acumulando evidencia de que ciertas proteínas no histonas se unen sólo a DNA homólogo, probablemente por reconocimiento de secuencias no presentes en otros organismos (114,115).

En contraste con las histonas, que constan solamente de cinco especies moleculares mayoritarias, las proteínas no histonas son una clase muy compleja. Las

proteínas no histonas de la cromatina de hígado de rata, de fibroblastos en cultivo, de Physarum polycephalum y otros sistemas (126,127), se han resuelto por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS en un patrón complejo compuesto por más de 100 bandas de proteína. La escala de pesos moleculares varía entre 15.000 y más de 100.000. Por técnicas de electroenfoque, se ha comprobado que estas proteínas presentan un margen considerablemente ancho de puntos isoeléctricos, desde pH 4 a pH 9 (128).

Sin embargo, y pese a lo que acabamos de mencionar, hay varias líneas de evidencia que sugieren que muchas de estas proteínas, no funcionan como agentes específicos de regulación genética, sino que tienen más bien papeles enzimáticos y estructurales.

Si la regulación genética en eucarióticos se realiza a través de mecanismos similares a los que operan en organismos procarióticos (por ejemplo el operón de la lactosa en E. coli), se puede postular, basándose simplemente en las diferencias en el contenido de DNA, que el núcleo de Physarum polycephalum, por ejemplo, podría contener 3.500 veces más de una

proteína reguladora similar al represor de la lactosa de E. coli. Así, si en E. coli hay 10 copias del represor de la lactosa por célula, cabría esperar que una proteína reguladora similar de Physarum esté presente en unas 35.000 copias. Aunque esta analogía es sin duda muy simplista, y quizás no del todo válida, sirve para demostrar que, aún cuando las proteínas reguladoras de los eucarióticos estén presentes en esas cantidades, no podrían detectarse por los procedimientos convencionales usados para aislar e identificar las proteínas no histonas cromosómicas, ya que los componentes minoritarios, detectables por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de alta resolución, deben estar presentes en concentraciones intranucleares de 60.000-80.000 copias por núcleo, como mínimo (129,130). En los patrones electroforéticos de las proteínas no histonas obtenidas de varios tipos celulares, los componentes mayoritarios están presentes en cantidades superiores al millón de copias por núcleo (129,131), por lo que parece lógico suponer que estas proteínas mayoritarias, que presentan cierta similitud en tipos celulares de distintos orígenes, no sean proteínas reguladoras, sino más bien proteínas que posean una función estructural común a todos los tipos de las células, de for-

ma similar a las histonas. Además, algunas de estas proteínas mayoritarias de la cromatina se han identificado como proteínas similares a la actina, miosina, troponina y tubulina (130,131) así como a la proteína mayoritaria presente en las partículas de ribonucleoproteína del núcleo (informosomas) (132). Se ha sugerido que estas proteínas contráctiles (actina, miosina, troponina, y quizás tubulina), podrían jugar un papel en la regulación de la condensación de la cromatina (heterocromatización), y de este modo, controlar de una manera indirecta la proliferación celular, así como también podrían desempeñar un papel en el movimiento de los cromosomas en la mitosis (130,131).

c) Proteínas con afinidad por DNA en líneas celulares en cultivo.

La técnica de cromatografía en columnas de DNA-celulosa, desarrollada por Alberts y col (81,82), ha sido uno de los métodos más utilizados en el aislamiento y purificación de proteínas con afinidad por DNA. Esta técnica que se basa en los principios generales de la cromatografía de afinidad (133) consiste en fijar un ligando específico para una proteína (en este caso DNA) a un soporte sólido e inerte (celulosa). Si se pasa una mezcla heterogénea de pro-

teínas a través de esta matriz, sólomente quedarán retenidas aquellas proteínas que tengan un receptor específico para el ligando empleado, permitiendo así su separación del resto de proteínas de la mezcla. Este método ha permitido el aislamiento de una serie de proteínas en organismos procarióticos relacionados con el metabolismo del DNA, que ya han sido mencionadas anteriormente (81-94). En organismos eucarióticos, también ha sido posible mediante esta técnica el descubrimiento de una serie de proteínas de características similares; por ejemplo, se ha descrito en células meióticas de Lilium (134), y en espermátocitos de mamíferos (135) una proteína que está implicada en la recombinación meiótica. También se han aislado proteínas capaces de estimular las actividades DNA- y RNA-Polimerasas en ensayos in vitro (136, 137). Así mismo, se han aislado de timo de ternera (138), y de Ustilago maydis (139) proteínas que facilitan la desnaturalización del DNA, sugiriendo así la posibilidad de que estas proteínas desempeñen una función general en la replicación y recombinación del DNA, tanto en organismos procarióticos como en los eucarióticos.

Salas y Green (140) aplicaron la técnica de cromatografía en columnas de DNA-celulosa en el estudio de la síntesis de proteínas con afinidad por el DNA en células animales en cultivo, con la finalidad de investigar el posible papel de estas proteínas en el control de la proliferación celular, ya que, como se mencionó anteriormente, las líneas celulares establecidas son un modelo excelente para estudiar los factores que regulan el crecimiento, al poder disponer de poblaciones homogéneas de células que se pueden manipular fácilmente. Así mismo, es posible controlar el estado fisiológico de crecimiento de las mismas (fase logarítmica, fase estacionaria), así como sincronizarlas artificialmente, lo que facilita el estudio del ciclo celular.

Salas y Green (140) demostraron en 1971 que la síntesis de proteínas con afinidad por el DNA en células animales en cultivo (línea establecida de fibroblastos de embrión de ratón, 3T6), difería considerablemente dependiendo del estado de crecimiento de las células. En fase de crecimiento logarítmico, uno de los picos de proteína (P6) obtenidos por electroforesis de las fracciones eluidas de la columna de DNA-celulosa, era prominente, pero se hacía en canti-

dades muy pequeñas en cultivos estacionarios. En experimentos con células sincronizadas, se encontró que la síntesis de esta proteína estaba acoplada a la del DNA celular. La síntesis de otra proteína (P8), que junto con la P6 eran los componentes mayoritarios del pico eluido con ClNa 0,15 M de las columnas de DNA-celulosa, estaba considerablemente aumentada en células detenidas al comienzo del periodo de síntesis del DNA. Por otra parte, Tsai y Green (141) comunicaron que la síntesis de la P8 de las líneas 3T6 y SB (fibroblastos diploides humanos) es alta en células en crecimiento, pero decrece en cultivos estacionarios.

Posteriormente se ha encontrado que en los perfiles electroforéticos de las proteínas con afinidad por columnas de DNA-celulosa de diferentes tipos de células, tales como fibroblastos, células epiteliales y linfoblastos, así como de células derivadas de distintas especies animales (ratón, hamster, pollo, hombre), aparecían dos picos de proteína con movilidades relativas similares a las de la P6 y P8, lo cual sugiere que estas proteínas podrían participar en procesos comunes y generales en todos los tipos de células diferenciadas (140-146). Por otra parte, también se ha encontrado que líneas establecidas y cultivos primarios se com-

portan de forma similar en lo que respecta a la síntesis de estas dos proteínas, lo cual indica que las alteraciones celulares que se producen durante el establecimiento de una línea celular no afectan apreciablemente a la síntesis de estas proteínas con afinidad por el DNA. El comportamiento de estas proteínas en líneas establecidas podría, pues, reflejar el comportamiento de las mismas en las células del organismo vivo.

Puesto que determinados virus oncogénicos alteran las propiedades de crecimiento de las células en cultivo (39-46), era de interés estudiar la síntesis de proteínas con afinidad por el DNA en células transformadas por dichos virus. Así, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre la síntesis de proteínas con afinidad por el DNA en clones de una línea de fibroblastos de hamster (NIL), y subclones de esta línea transformados por el virus del poliovirus (NIL-Py) o el virus del sarcoma de hamster (NIL-HSV), han demostrado que la proteína 8 está considerablemente reducida en cultivos densos de células NIL, pero es muy prominente en las células transformadas en fase estacionaria (142). Estos niveles muy altos de P8 en células transformadas en cultivo denso se observaron

en todos los clones de células transformadas examinados, lo que indica que este comportamiento de la P8 se encuentra relacionado con el estado transformado de las células y no es el resultado fortuito de la selección clonal. Además, el comportamiento de la P8 es independiente de la clase de virus transformante, observándose tanto en células transformadas por un virus oncogénico que contenga RNA como por un virus DNA. Estos resultados hacen que la P8 pueda considerarse como un marcador bioquímico del estado transformado inducido por virus (142).

Tsai y Green comunicaron también que la P8 de las líneas 3T6 y SB presentaba afinidad específica por DNA desnaturalizado, no detectándose unión a DNA nativo, propiedad que utilizaron para su purificación (141).

Por todo ello, consideramos de interés estudiar las propiedades de la P8 de la línea NIL-HSV, entre ellas su interacción con el DNA, en un intento de caracterizar su función biológica.

Para ello, se ha puesto a punto un método de purificación a gran escala de la P8 de la línea NIL-HSV, y se han estudiado algunas de las características

fisicoquímicas de la proteína purificada, tales como su peso molecular en condiciones disociantes y en estado nativo, su composición en aminoácidos, y su punto isoeléctrico. También se ha estudiado su interacción in vitro con el DNA, demostrándose que la proteína tiene afinidad por DNA de una sola banda pero no por DNA nativo. Así mismo se ha comprobado que la P8 también interacciona con RNA y poli A. La interacción de la P8 con los ácidos nucleicos produce un complejo insoluble, que se puede sedimentar a baja velocidad. La estequiometría de este complejo insoluble ha sido también estudiada en este trabajo.

Los resultados obtenidos se discuten en relación con la posible función fisiológica de la P8.

MATERIALES

A) LINEAS CELULARES

Las células utilizadas fueron de la línea establecida de fibroblastos normales de hamster NIL 2e (147) (clon NIL-1), transformada por el virus del sarcoma de hamster (NIL-1-HSV), que fueron donadas por el Dr. I.A. Macpherson, del Imperial Cancer Research Fund, Londres.

B) MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó el medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (148) adquirido a Grand Island Biological Company (GIBCO), o preparado en nuestro laboratorio.

Los aminoácidos y las vitaminas se compraron a Sigma Chemical Co. y a BDH, y las sales inorgánicas, la glucosa, el ácido succínico, el succinato sódico y el rojo fenol a Merck.

La penicilina G (sal potásica) se compró a Calbiochem y la estreptomicina a Serva Feinbiochemica.

C) SUERO

Se empleó suero de ternera que se obtuvo de Flow Laboratories Inc. o de GIBCO.

D) PRODUCTOS RADIATIVOS.

La timidina-metil- H^3 (20 Ci/mmol), la timidina-2- C^{14} (5 Ci/mmol), la uridina- H^3 (29 Ci/mmol) y la L-prolina (G- H^3) (1 Ci/mmol), se compraron a New England Nuclear o a Radiochemical Centre (Amersham).

El poli dA-dT (metil- H^3) (21,6 μ Ci/ μ mol de fósforo) y el poli A (8- C^{14}) (0,77 μ Ci/ μ mol de fósforo), se obtuvieron de Miles Laboratories Inc.

La colchicina- H^3 (anillo C-metoxil- H^3) (30 Ci/mmol) se compró a Radiochemical Centre (Amersham).

El ATP- γ - P^{32} (2,5 Ci/mmol) se obtuvo de Radiochemical Centre (Amersham).

E) ENZIMAS

La RNasa pancreática (recristalizada una vez), la DNasa I pancreática (recristalizada una vez) y li-

bre de RNasa, y la tripsina se compraron a Worthington Biochemical Corporation.

La RNA-polimerasa altamente purificada de Bacillus subtilis, fue cedida generosamente por la Dra. Margarita Salas.

F) PROTEINAS UTILIZADAS COMO MARCADORES

La seroalbúmina de bovino, la ovoalbúmina, la catalasa y la hemoglobina (de sangre de buey), se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La γ -globulina humana (fracción II), el quimotripsinógeno y la mioglobina (de esperma de ballena) procedían de Mann Research Laboratories. El citocromo C se compró a Calbiochem, y la láctico deshidrogenasa, la β -galactosidasa y la fosforilasa a aBoehringer Mannheim.

G) ACIDOS NUCLEICOS

El DNA de timo de ternera (sal sódica, altamente polimerizado) se obtuvo de Worthington Biochemical Corporation. El poli A (ácido poliadenílico, sal potásica, $S_{20} = 8,1$) se compró a Miles Laborato-

ries Inc. y el poli (dA-dT) : ácido polidesoxiadení-
lico-desoxitimidílico, poli (dA-dT) poli(dA-dT),
sal sódica, S_{20} : 11,75, de doble cadena (cada cade-
na contiene dA y dT en secuencia alternativa), se ob-
tuvo de P-L Biochemicals, Inc.

El DNA del bacteriófago Ø29, tanto frío como
marcado radioactivamente fue cedido generosamente
por la Dra. Margarita Salas.

H) OTROS PRODUCTOS QUIMICOS

El SDS y el Nonidet P40 se obtuvieron de BDH
Chemicals Ltd. y el sulfóxido de dimetilo de Fisher
Scientific Co. El Tris, la fosfocelulosa (1,8 meq/
gr), y la agarosa eran de Sigma Chemical Co. y la
sacarosa, de May and Baker U.C.B. La celulosa Munk-
tell's 410, el Biogel P-200, la acrilamida y la N-
N'-metilen bisacrilamida se compraron a Bio-Rad La-
boratories, y el Temed y el persulfato amónico, a
Canal Industrial Corporation (Canalco). Los anfoli-
tos de distintas escalas de pH se compraron a LKB
(Bromma, Suecia). La urea y la glicerina eran de
Carlo Erba.

El tubo de diálisis, el azul de Coomassie R-250 y G-250 y el 2-mercaptoetanol se obtuvieron de Serva Feinbiochemica, y las membranas Diaflo UM-10 para concentración por ultrafiltración se adquirieron a Amicón Corporation. Los discos de nitrato de celulosa HAWP de 25 mm de diámetro y 0,45 micras de poro eran de Millipore.

Los demás reactivos se adquirieron a las casas comerciales de mayor garantía.

I) DETERMINACION DE RADIATIVIDAD.

El butil-PBD se obtuvo de Ciba Limited, el papel de fibra de vidrio Whatman GF/A o GF/C, de Reeve Angel, y el tolueno y el dioxano, de Carlo Erba. El PPO y el dimetil POPOP se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

J) PLACAS DE PLASTICO PARA CULTIVO DE CELULAS

Las placas Petri de plástico de 35, 60 y 90 mm de diámetro se compraron a Falcon Plastics.

K) EQUIPO

Centrífugas Wifug, BHG, modelo Roto-Uni II;
Sorvall, modelos SS-3, RC-2 y RC-2B con sistema
KSB para flujo continuo.

Ultracentrífugas Spinco de Beckman, modelos
L2-50, L3-50 y L2-65B.

Ultracentrífuga analítica Beckman modelo E
con óptica de interferencia Rayleigh.

Contadores de centelleo líquido : Packard
Tricarb, modelos 3003 y 3320, y Nuclear Chicago
Mark II.

Espectrofotómetros : Beckman DU-2, Beckman
DB-GT y Gilford modelo 2400.

Sonicador MSE 7100.

Colector de fracciones automático y refrige-
rado Isco modelo 600 con registro incorporado mode-
lo UA-4 y alternador de canales modelo 1130; colec-
tor de fracciones Buchler, modelo fractomette 200.

Baño termostatzado para circuito de refrigeración Lauda modelo K2RD.

L) SOLUCIONES TAMPON

El PBS contiene ClNa 0,137 M; ClK 2,68 mM; PO_4HNa_2 8,1 mM y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,47 mM.

La solución salina estandar de citrato (1 x SSC) contiene ClNa 0,15 M y citrato sódico 0,015 M.

El tampón de diálisis (TD) contiene Tris-ClH 20 mM, pH 8,1; ClNa 50 mM; EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM.

El tampón de lavado (TL) lleva Tris-ClH 20 mM, pH 8,1; ClNa 50 mM; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 1 mM y glicerol al 10%.

El tampón de lavado con seroalbúmina (TLSAB) está constituido por TL con seroalbúmina de bovino a una concentración de 0,5 mg/ml.

METODOS

A) CULTIVOS CELULARES1) Medios de cultivo, soluciones y esterilización.

El medio de cultivo empleado fue el medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que se preparó en nuestro laboratorio según el siguiente protocolo :

Constituyentes para preparar 10 litros.

ClNa		64 g
ClK	20%	20 ml
Cl ₂ Ca . H ₂ O	26,5%	10 ml
SO ₄ Mg . 7H ₂ O	20%	10 ml
PO ₄ H ₂ Na . 2H ₂ O	14%	10 ml
Glucosa		45 g
Nitrato férrico	0,01%	10 ml
Penicilina G (sal potásica)		10 ⁶ unid.
Estreptomicina		1 g
Antimicótico (n-butil-p-hidroxi- droxi-benzoato)	0,02%	10 ml
Piruvato sódico		1,1 g
R rojo fenol	1%	15 ml
CO ₃ HNA		37 g
Aminoácidos concentrados		500 ml
Vitaminas concentradas		80 ml

Para preparar el medio, las sales que no están en solución se disolvieron previamente en agua destilada a 40°C. Los aminoácidos y las vitaminas se calentaron a 56°C hasta que se disolvieron completamente. Las soluciones se añadieron en el orden indicado al tanque de presión, se mezclaron y se llevó hasta el volumen final con agua destilada fría

Se burbujeó CO_2 al 10% en aire hasta que la solución tomó un color naranja correspondiente a un pH de 7,3 - 7,4. El medio se esterilizó por filtración con presión positiva de nitrógeno a través de membranas de nitrocelulosa con un poro de 0,2 micras de diámetro (Sartorius). La filtración se llevó a cabo en ambiente estéril, empleando una cabina de flujo laminar Telstar. El medio se distribuyó en alícuotas y se almacenó en nevera a 4°C hasta el momento de su utilización.

Antes de usarse, se añadió al medio una solución de glutamina estéril (35,04 g/l), almacenada a -20°C, hasta una concentración final de 0,58 g/l).

Solución concentrada de aminoácidos para el
DMEM.

Componentes para preparar 1 litro:

L-Arginina mono ClH	1,68 g
L-Cistina (disolver en 1 ml de NaOH 1N)	0,96 g
L-Histidina mono ClH	0,84 g
L-Isoleucina	2,096 g
L-Leucina	2,096 g
L-Lisina mono ClH	2,924 g
L-Fenil-alanina	1,320 g
L-Treonina	1,904 g
L-Triptófano	0,32 g
L-Tirosina	1,448 g
L-Valina	1,872 g
L-Metionina	0,60 g
Inositol	0,14 g
L-Serina	0,84 g
Glicina	0,60 g
Rojo fenol 1%	0,04 g

Se añadieron los aminoácidos uno a uno a agua destilada caliente (aproximadamente 2/3 del volumen final) y se agitó hasta disolverlos, para lo cual se calentó alrededor de 56°C (sin pasar de 60°C). A continuación se enfrió a temperatura ambiente y se ajustó el pH de la solución a 10 con NaOH 1N, realizándose las medidas en un pHmetro

Radiometer con escala expandida. Se completó el volumen final de la solución con agua destilada y se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -20°C .

Solución concentrada de vitaminas para el
DMEM.

Componentes para preparar 160 ml :

Cloruro de colina	0,8 g
Acido fólico (disolver en 8 ml de NaOH 1N)	0,8 g
Nicotinamida	0,8 g
DL-ácido pantoténico, sal Ca^{++}	0,8 g
Piridoxal ClH	0,8 g
Tiamina ClH	0,8 g
Riboflavina	0,8 g

Las vitaminas se disolvieron en agua destilada repartiéndose a continuación en alícuotas que se almacenaron congeladas a -20°C .

El suero de ternera utilizado para suplementar el medio (de Gibco o de Flow) se guardó congelado a -20°C , añadiéndose al medio a una concentración del 10% en el momento de su uso, incubándose la mezcla en baño de agua a 37°C durante varios minutos antes de su utilización.

La solución de tripsina (Worthington) empleada para resuspender las células se preparó a una concentración del 0,25% en PBS, como se indica a continuación.

Componentes para 1 litro

Tripsina (181 u/mg)	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Penicilina G	10 ⁵ unid.
Estreptomicina	0,1 g
Rojo fenol (1%)	1,5 ml
PBS completar hasta	1000 ml

La tripsina, la glucosa, los antibióticos y el rojo fenol se añadieron a la solución salina, agitándose en un agitador magnético a temperatura ambiente hasta su disolución. El pH de la solución se ajustó a 7,2-7,3 con NaOH 1N.

La solución de EDTA empleada para desprender las células de las botellas de cultivo se preparó añadiendo a 1 litro de PBS, 0,2 g de glucosa y 0,213 g de EDTA (sal disódica).

La solución de tripsina y la de EDTA se esterilizaron por filtración mediante presión positiva, y se guardaron congeladas hasta su uso. El PBS se esterilizó por autoclave a una presión de 1 kg/cm durante 15 minutos.

2) Mantenimiento de las líneas celulares y crecimiento en gran escala de las células.

Las células se cultivaron en placas Petri de plástico de 60 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con suero de ternera al 10%. El medio se cambió cada dos días, y las células se subcultivaron rutinariamente cuando alcanzaron densidades elevadas. Las células se incubaron a 37°C en un incubador Forma con flujo de CO₂ y aire, en proporción de 5% CO₂ y 95% aire.

El manejo de las células se realizó en cabinas esterilizadas por irradiación previa con luz ultravioleta.

Para subcultivar las células se absorbió el medio de las placas con una pipeta Pasteur conectada

a una fuente de vacío y se lavó la monocapa celular con tripsina al 0,25% precalentada a 37°C (0,5 volúmenes respecto al medio de cultivo), eliminándose por succión. Se añadieron de nuevo 2 ml de solución de tripsina por placa, incubándose a 37°C durante 3-5 minutos, y resuspendiéndose a continuación las células. Las células se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Wifug, y, después de retirar el sobrenadante, se resuspendieron en una cantidad adecuada de medio de cultivo y se inocularon en nuevas placas.

El conteo del número de células se realizó empleando una cámara hemocitométrica (Albert Sass) y bajo observación en un microscopio invertido Nikon de contraste de fases.

El crecimiento de las células en gran escala se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se inocularon células en placas Petri de plástico de 90 mm de diámetro, incubándose hasta confluencia ($30-40 \times 10^6$ células por placa). A continuación se tripsinizaron las células con 4 ml de solución de tripsina, y, una vez resuspendidas por pipeteo, se inocularon en botellas Pirex de 1 litro de capaci-

dad con 100 ml de medio DMEM con suero de ternera al 10%, a razón de dos botellas por placa. Las botellas se incubaron a 37°C en un aparato rotatorio Bellco, cambiándose el medio al 3^{er}-4^o día, y continuando la incubación durante unos 2-3 días más, al cabo de los cuales las botellas aparecen confluentes. Se retiró el medio y a continuación se lavaron las células dos veces con PBS estéril.

Las células se desprendieron con 40 ml de solución de EDTA en PBS por botella y se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en frío en el rotor GSA de una centrífuga Sorvall refrigerada. El sedimento celular se guardó congelado a -70°C hasta su utilización para preparar el extracto celular.

Para limpiar las botellas ya utilizadas, se añadieron 200 ml de hipoclorito al 5% por botella y se dejaron en el aparato rotatorio durante un día, con el fin de eliminar posibles restos de células.

Cada 5-7 pases, las células se desecharon, iniciándose un nuevo cultivo con células previamente congeladas, como se describe a continuación : Mo-

nocapas próximas a confluencia se tripsinizaron y se resuspendieron en DMEM-suero de ternera 10% (aproximadamente 10 ml por cada 7×10^6 células). Las células se sedimentaron por centrifugación a $1000 \times g$ durante 5 minutos y se resuspendieron pipeteando suavemente en el medio anterior (2×10^6 células por ml) conteniendo glicerol estéril al 10%. Alícuotas de 1-2 ml se distribuyeron en ampollas de vidrio estériles, que se cerraron a la llama de un mechero Bunsen. Las ampollas se almacenaron primero en un congelador de -20°C , de modo que la temperatura de las mismas bajase aproximadamente 1°C por minuto, y después se almacenaron a -70°C en un congelador Kelvinator o a -180°C en nitrógeno líquido.

3) Cultivos radiactivos.

Para marcar las células con precursores radiactivos, los cultivos se crecieron en presencia de suero al 10%, dializado contra PBS.

Para el marcaje del DNA las células de la línea NIL-1-HSV se crecieron en botellas Pirex de 1 litro, cambiando el medio al 29 día del inóculo, y

continuando la incubación durante 48 horas más con medio que contenía timidina- ^3H (20 Ci/mmol; 1 mCi/ml) a una concentración de 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio, o timidina ^{14}C (5 Ci/mmol; 0,1 mCi/ml) 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio. En estas condiciones, las células se encontraban en la fase logarítmica del crecimiento durante la exposición al precursor radiactivo.

Para marcar radiactivamente las proteínas, las células se crecieron de forma habitual en botellas de 1 litro, y al efectuarse el cambio de medio, al 3^{er}-4^o día del inóculo, se añadió prolina- H^3 (1 Ci/mmol) a una concentración de 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio, continuándose la incubación por espacio de 48 horas, al final de las cuales las células se encontraban en fase estacionaria.

Para obtener el RNA radioactivo, cultivos creciendo exponencialmente se marcaron durante 18 horas con 0,2 mCi de uridina- H^3 (29 Ci/mmol) por botella de cultivo.

B) PURIFICACION DE LA PROTEINA 8 DE NIL-HSV.

1.- Preparación de las columnas de DNA-celulosa

Para la preparación de la DNA-celulosa en grandes cantidades se utilizó una modificación de los métodos de Alberts (84) y de Litman (149).

a) DNA. Se utilizó DNA de timo de ternera, el cual se disolvió a una concentración de 2 mg/ml en un tampón que contenía Tris-ClH 10 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM (tampón Tris-EDTA). La disolución se realizó con agitación lenta a 40°C.

El DNA nativo se desnaturalizó calentando la solución en un baño de agua a 100°C durante 15 minutos, enfriándose inmediatamente en un baño de hielo para evitar la renaturalización. Cuando el volumen de la solución de DNA fue superior a 50 ml, el calentamiento se realizó en alícuotas de 50 ml para que el enfriamiento posterior no fuese demasiado lento.

b) Celulosa. Se empleó celulosa Munktell's 410 para las columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa y celulosa Whatman (Chromedia Microgranular)

para las columnas de DNA (nativo) -celulosa. La celulosa se lavó sucesivamente por agitación en : etanol absoluto, 30 minutos; agua destilada, 30 minutos; NaOH 1N, 15 minutos; agua destilada, 15 minutos; ClH 1N, 15 minutos, y de nuevo agua destilada hasta conseguir que el pH de los lavados fuese neutro. Los lavados se hicieron en probeta de 2 litros (100 g celulosa) con agitación mediante un agitador magnético, y dejando sedimentar a continuación la celulosa, eliminándose por succión al sobrenadante con los finos.

Después de retirar el sobrenadante de pH neutro, la celulosa se filtró bajo succión a través de papel de fibra de vidrio Whatman GF/A en un embudo Buchner. La pasta resultante se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

c) Adsorción del DNA a la celulosa.

La celulosa lavada y seca se añadió poco a poco y con agitación lenta sobre la solución de DNA (nativo o desnaturalizado) en una proporción de 1 g de celulosa por cada 6 ml de solución. La pasta resultante se extendió sobre una plancha de plástico,

se tapó con una gasa y se secó con corriente de aire frío durante la noche. La costra seca se despegó de la plancha y se pulverizó en un mortero. El polvo resultante se repartió en alícuotas de 25 g y se resuspendió en etanol absoluto (400 ml por alícuota), irradiándose durante una hora y media con una lámpara germicida de luz ultravioleta, colocada a una distancia de unos 10 cm de la suspensión, agitándose suavemente ésta durante el periodo de irradiación. Seguidamente, el etanol se eliminó por filtración bajo succión a través de papel Whatman GF/A y la DNA-celulosa se lavó tres veces por agitación en tampón Tris-EDTA, para eliminar el DNA que no se unió a la celulosa. El sobrenadante del 3^{er} lavado no dió absorción a 260 nm. El sedimento se resuspendió de nuevo en tampón Tris-EDTA y se filtró bajo succión por papel Whatman GF/A. Finalmente, la pasta resultante se extendió y se secó en un desecador a vacío.

La estimación del DNA adsorbido a la celulosa se llevó a cabo de la siguiente manera : se pesó una alícuota del polvo seco de DNA-celulosa y tras resuspenderla en tampón Tris-EDTA, se hirvió durante 10 minutos, con el fin de desprender el DNA fijado a la

celulosa, y a continuación, se enfrió rápidamente en baño de hielo. Después de eliminar la celulosa por centrifugación, el DNA se valoró espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica del sobrenadante a una longitud de onda de 260 nm.

Según este procedimiento, la cantidad de DNA fijado a la celulosa fue de 8-10 mg DNA (nativo)/g celulosa, y de 2-4 mg DNA (desnaturalizado)/g de celulosa. Los distintos preparados de DNA-celulosa se reunieron y se guardaron como polvo seco a -20°C, tomándose alícuotas para preparar las columnas que no se usaron más de 5-10 veces.

La DNA-celulosa así preparada es estable a -20°C por espacio de varios años, aunque una vez empaquetada en la columna y a medida que se va utilizando, la cantidad de DNA fijada disminuye apreciablemente en el caso de DNA nativo pasando de 8 mg a 4-5 mg por gramo de celulosa al cabo de unas 6 cromatografías. El DNA desnaturalizado es algo más estable y baja de 2,5 mg iniciales a 1,6-1,8 mg, después de unas 10 cromatografías.

d) Preparación de las columnas de DNA-celulosa.

El polvo de DNA-celulosa se resuspendió en TL + SAB y se empaquetó en columnas de vidrio, equilibrándose con el mismo tampón. Las columnas utilizadas contenían 25, 50 ó 80 g de DNA(nativo)-celulosa (6-8 mg DNA/g de celulosa) y 25 ó 40 g de DNA (desnaturalizado)-celulosa (1,6-2 mg DNA/g de celulosa), conservándose a 4°C en cámara fría.

2.- Preparación de extractos celulares

En un experimento típico, las células procedentes de 30-40 botellas crecidas hasta confluencia se resuspendieron en 80 ml de tampón de sonicación (Tris-ClH 40 mM, pH 8,1; 2-mercaptoetanol 1 mM; EDTA 0,2 mM y Cl_2Mg 10 mM) dispersándose con un homogeneizador Potter-Elvehjem. A continuación las células se desintegraron ultrasónicamente en tres alícuotas de unos 30 ml, con un desintegrador ultrasónico MSE, mediante seis pulsos de 10 segundos a una amplitud de oscilación de siete micras, manteniendo la suspensión en baño de hielo.

El homogenado se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 rpm y 4°C en un rotor SS-34 de Sorvall para eliminar restos celulares. El sobrenadante se trató con 30 µg/ml de DNasa I libre de RNasa durante 30 minutos a temperatura ambiente y se dializó a continuación contra 75 volúmenes de tampón de diálisis (Tris-ClH 20 mM, pH 8,1; ClNa 50 mM; 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 1 mM) durante la noche y a 4°C, con un cambio de tampón a las 3 horas.

3.- Cromatografía en columnas de DNA-celulosa.

a) Cromatografía en columna de DNA (nativo)-celulosa.

Al extracto celular dializado se añadió seroalbúmina de bovino y glicerol hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y 10%, respectivamente, y se aplicó a una columna de DNA-(nativo)-celulosa equilibrada con TL + SAB. Una vez que el extracto hubo penetrado en el lecho de la columna, se cortó el flujo durante 20 minutos para favorecer la fijación de las proteínas que se unen al DNA (81). Seguidamente se reanudó el flujo, lavándose la columna con TL + SAB hasta que la absorción del lavado fue igual a la

del tampón de equilibrio de la columna. A continuación se lavó la columna con TL y una vez estabilizada la línea de base, se eluyó con TL que contenía sucesivamente ClNa 0,15 M y 2 M hasta que las líneas de base respectivas se estabilizaron de nuevo. El flujo del proceso cromatográfico fue de 0,5 ml/minuto durante el paso del extracto por la columna, y de 1-2 ml/minuto en las eluciones con ClNa 0,15 y 2 M. La columna se regeneró lavándola extensamente con TL + SAB.

b) Cromatografía en columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa.

Las fracciones del lavado de la columna anterior se aplicaron a una columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa, procediéndose a continuación de modo análogo al descrito en el apartado anterior.

La cantidad de proteína aplicada y fijada a las distintas columnas se detalla más adelante (ver Resultados).

4.- Cromatografía sobre fosfoCelulosa

El pico de proteína eluido de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa con TL con ClNa 0,15 M

se concentró mediante filtración en una célula Amicon modelo 52 utilizando una membrana Diaflo UM-10 o UM-20E. La recuperación obtenida osciló entre el 60-80%. A continuación se dializó contra 2 litros de TL durante la noche en cámara fría.

El pico de ClNa 0,15 M concentrado y dializado se aplicó a una columna de fosfocelulosa de un volumen de 1-2 ml equilibrada con TL y se pasó a un flujo de 0,1-0,2 ml/minuto, lavándose con 20 ml de TL. A continuación se eluyó con TL que contenía ClNa 0,1 M y 2 M, recogiendo fracciones de 1-2 ml, y determinándose la absorción óptica de las mismas a 280 y 260 nm. En el caso de proteínas radiactivas se tomaron alícuotas de cada fracción y se pipetearon en discos de fibra de vidrio Whatman GF/A, los cuales se secaron en estufa y se introdujeron en viales a los que se añadieron 3 ml de una solución de centelleo que contenía 4 gramos de butil-PBD por litro de tolueno, 6 g de PPO y 40 mg de dimetil-POPOP por litro de tolueno, determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Las fracciones correspondientes al pico de proteína eluida con ClNa 0,1 M se reunieron y se con-

centraron por filtración en una célula Amicon, modelo 12 con una membrana UM-10. Después de centrifugar el concentrado para eliminar proteína desnaturalizada, se dializó contra el tampón adecuado y después se repartió en alícuotas, que se guardaron congeladas a -70°C hasta el momento de su uso.

Las cromatografías se llevaron a cabo en un colector de fracciones refrigerado ISCO, siguiéndose los picos de proteína por su absorción a 280 nm en un registro óptico incorporado. Todas las operaciones del proceso de purificación se realizaron en frío.

La concentración de proteína se estimó de modo aproximado por el método de Kalckar (150), midiendo la densidad óptica a 280 y 260 nm, y aplicando la fórmula siguiente :

$$\text{concentración de proteína (mg/ml)} = 1,45 \times D_{280} - 0,74 \times D_{260}$$

Para una valoración más precisa de la concentración de proteína, se utilizó el método de Lowry (151) utilizando seroalbúmina de bovino como patrón.

5.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

a) Preparación de las muestras

De los distintos picos de proteína del proceso de purificación se tomaron alícuotas de 20-50 µg, que se precipitaron añadiendo TCA hasta una concentración final del 10%, dejándose en baño de hielo durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 minutos y a 0°C en un rotor SS-34 de una centrífuga Sorvall refrigerada.

Los sobrenadantes se retiraron con pipeta Pasteur, y los sedimentos se lavaron por resuspensión en una solución de etanol + éter (1:1). Después de centrifugar 20 minutos a 8.000 rpm, se decantaron los sobrenadantes y los sedimentos se volvieron a lavar por resuspensión en etanol-éter (1:3). Por último, se centrifugó durante 30 minutos, se decantaron los sobrenadantes y los sedimentos se dejaron secar. Una vez secos, se disolvieron en 0,2 ml de tampón de ruptura constituido por tampón de electroforesis (Tris (3 g/litro)-glicocola (14 g/litro), pH 8,3) con SDS y 2-mercaptoetanol al 1%, y se hirvieron en baño de agua durante 2 minutos. A continuación, se añadió sa-

carosa sólida hasta saturación, para aumentar la densidad de la solución, y 2 µl de azul de bromofenol al 0,25% (P/V), como marcador del frente de la electroforesis.

b) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El método de electroforesis utilizado para seguir rutinariamente el proceso de purificación de la proteína 8 de la línea NIL-HSV se basó en el de Ornstein (152) y Davis (153), en el que la electroforesis se lleva a cabo en un sistema discontinuo de geles y pH.

Se utilizaron geles de dos partes : un gel superior de poro ancho o gel concentrador, y un gel inferior de poro estrecho o gel separador.

El gel concentrador contenía acrilamida a una concentración del 2,5% (P/V) y N,N'-metilenbisacrilamida al 0,625% (P/V) en un tampón Tris-ClH 62,5 mM, pH 7,0 y TEMED al 0,06% (V/V). Como catalizador de la reacción de polimerización se utilizó riboflavina a una concentración de 0,005 mg/ml. La riboflavina actúa como catalizador fotoquímico en presencia de luz de baja longitud de onda, mientras el TEMED

actúa como iniciador de la reacción de polimerización.

El gel separador contenía acrilamida al 7% y N-N'-metilenbisacrilamida al 0,17% en un tampón Tris-ClH 0,375 M, pH 9,2 y TEMED al 0,03%. Como catalizador de la polimerización se utilizó persulfato amónico a 0,7 mg/ml. Ambos geles contenían SDS al 0,1%.

Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 5,5 mm de diámetro interno, polimerizándose primero el gel separador de 7-8 cm de altura y sobre éste el gel concentrador de 0,6-0,8 cm de altura. Las columnas de vidrio con los geles se colocaron en una cubeta de electroforesis de Hoeffer Scientific Instruments que contenía tampón de electroforesis con SDS al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente con una intensidad constante de 3 mA por gel, durante 2 horas aproximadamente, utilizando una fuente de alimentación Buchler o Biorad.

Basándonos en las observaciones de Shapiro, Viñuela y Maizel (154), la electroforesis se realizó

en presencia del detergente aniónico SDS, con lo que la separación de las subunidades de las proteínas depende del peso molecular de las cadenas polipeptídicas. Como ya hemos dicho, durante la preparación de las muestras, las proteínas nativas se disolvieron en una solución que contenía SDS al 1%. El SDS a esta concentración produce cambios conformacionales en las proteínas formándose complejos de los polipéptidos desnaturalizados con el SDS.

Tandford (155) demostró que la unión de grandes cantidades de dodecil sulfato a una proteína es, primariamente, de naturaleza hidrofóbica y que, en las condiciones utilizadas para la electroforesis, el número de moléculas de dodecil sulfato unidas a cualquier molécula de proteína es directamente proporcional al peso molecular de la proteína. Esto es consistente con la observación (154) de que se pierde toda especificidad proteica y la movilidad es solamente una medida del tamaño molecular.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 al 0,25% (P/V) en metanol-acético-agua (5:1:5) durante 12 horas, destiñéndose a continuación en un aparato Hoef-

fer Scientific Instruments, con una solución de acé-
tico al 7%. Una vez desteñidos los geles, se alma-
cenaron sumergidos en agua destilada en tubos de vi-
drio.

Los geles radiactivos se cortaron en fraccio-
nes de 0,7 mm de espesor, empleando un "Gel-Slicer"
automático (The Mickle Laboratory Engineering Co.).
Las fracciones se introdujeron en viales de vidrio
a los que se añadió 0,25 ml de una solución de SDS
al 0,1%. Los viales se incubaron con agitación a
37°C durante la noche para eluir la proteína de las
fracciones del gel. Esta se adsorbió a continuación
sobre discos de papel Whatman GF/A, los cuales se
secaron en estufa y finalmente se determinó la ra-
diactividad como se mencionó anteriormente.

C) PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA PROTEINA 8 DE
NIL-HSV.

1.- Peso molecular en presencia de SDS.

El peso molecular de la proteína 8 de la lí-
nea NIL-HSV en presencia de SDS, es decir, el peso
molecular de la cadena polipeptídica, se determinó
por electroforesis en geles de poliacrilamida según

dos sistemas diferentes : el sistema utilizado para el proceso de purificación (Ornstein y Davis) y el sistema de Weber y Osborn (156).

Este último es un sistema de pH continuo y sólo utiliza el gel separador, que contiene acrilamida al 10% y bisacrilamida al 0,27% en un tampón fosfato sódico 0,07 M, pH 7,0 y TEMED 0,15%. Como catalizador se utilizó persulfato amónico (0,75 mg/ml). El gel contenía también SDS al 0,1% (P/V).

Los geles, de 8 cm de altura, se colocaron en una cubeta de electroforesis que contenía un tampón fosfato sódico 0,07 M pH 7,0 con SDS al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo a una intensidad constante de 8 mA por gel con el electrodo positivo en la cámara inferior, durante unas 4-5 horas.

Se utilizaron como marcadores de peso molecular conocido las siguientes proteínas : β -galactosidasa (130.000); fosforilasa a (94.000); seroalbúmina de bovino (68.000); γ -globulina, cadena pesada (50.000); ovoalbúmina (45.000); lactico deshidrogenasa (35.000); quimotripsinógeno (25.000) y mioglobina (17.200) (156).

Una vez concluida la electroforesis, se midió la longitud de los geles, así como la distancia recorrida por el frente de azul de bromofenol. Después de teñir y desteñir los geles, según se ha descrito anteriormente, y debido a que en este sistema el frente de azul de bromofenol desaparece, y los geles se hinchan en la solución de ácido acético utilizada para desteñirlos, el cálculo de la movilidad relativa de las bandas de proteína se realizó según la fórmula :

$$\text{Movilidad} = \frac{\text{distancia de emigración de proteína}}{\text{longitud del gel después del desteñido}} \times \frac{\text{longitud antes de la tinción}}{\text{distancia de emigración del frente}}$$

Las movilidades relativas de las distintas bandas de proteína obtenidas con los dos sistemas de electroforesis se representaron gráficamente frente a sus respectivos pesos moleculares en una escala se milogarítmica. El peso molecular de la proteína 8 se determinó a partir de esta gráfica patrón.

2.- Análisis de aminoácidos de la proteína 8.

Se utilizó el método de hidrólisis con ácido p-toluen-sulfónico, que permite detectar el triptófano (157). Alícuotas de 25 µg de proteína 8 purificada se precipitaron con TCA y se lavaron con etanol-éter como se ha descrito para las electroforesis en geles de poliacrilamida. Los sedimentos secos se hidrolizaron con 50 µl de ácido p-toluen-sulfónico 3N conteniendo triptamina al 0,2% durante 22, 48 y 72 horas a 110°C en vacío. Al término del tiempo de hidrólisis, las muestras se neutralizaron con hidróxido de litio 3N, ajustándose el pH a 2,2, y añadiendo a continuación 100 µl de citrato de litio 0.15 M, pH 2,2.

Alícuotas de 20 µl de cada muestra se procesaron en un analizador automático Durrum según el método de Lee (158). Las proporciones de los distintos aminoácidos se determinaron por comparación de las áreas de los picos de las muestras de P8 con las correspondientes a una muestra standar de aminoácidos.

Los valores calculados para los aminoácidos serina, treonina y triptófano, se extrapolaron a tiempo cero, y en el caso de la leucina y la valina

se tomaron los valores correspondientes al tiempo mayor de hidrólisis (72 horas). Los valores de los demás aminoácidos se calcularon haciendo la media de los valores obtenidos en los tres tiempos de hidrólisis.

3.- Electroenfoque en gel de poliacrilamida

La proteína 8 purificada se sometió a electroenfoque en placa de poliacrilamida utilizando el aparato LKB 2117 Multiphor, según el procedimiento desarrollado por Karlsson et al (159) basado en las observaciones de Vesterberg (160), con una modificación adicional que consistió en aplicar las condiciones de disociación descritas por O'Farrell (161) para la resolución bidimensional de las proteínas totales de E. coli.

En estas condiciones, la proteína se disocia por calentamiento en presencia de SDS y urea a alta concentración para evitar agregados que impidan su penetración en el gel, y, una vez disociada, se añade el detergente no iónico Nonidet P-40 que actúa como agente secuestrante del SDS, con lo que las cadenas polipeptídicas disociadas recuperan su carga original correspondiente. Esto permite el electroen-

foque de las mismas que se realiza en presencia de urea para impedir la reasociación de los polipéptidos.

Se utilizó un gel que contenía acrilamida al 5%; N-N'-metilenbisacrilamida al 0,15%; NP40 al 2%; urea 9 M; TEMED al 0,05%, y anfolitos (LKB) : pH 3-10, 1,86%; pH 7-10, 0,26%; pH 5-8, 0,13% y pH 3-6, 0,13% (escala final de pH, 3-10). Como catalizador de la polimerización se utilizó persulfato amónico al 0,1%.

El gel se preparó en forma de placa de 260 x 125 mm y 1,5 mm de espesor, y se guardó en nevera hasta el momento de su uso cubierta con papel de celofán para evitar su desecación.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera : a alícuotas de 15 μ l de P8 purificada y dializada contra TL diluido 5 veces con agua ($TL^{1/5}$), a una concentración de 1,7 mg/ml, y de hemoglobina de sangre de buey (1,7 mg/ml en $TL^{1/5}$), se añadió un volumen igual de tampón de ruptura (SDS 1%; 2-mercaptoetanol 10%; urea 9 M y anfolitos pH 3-10 al 4%) y

se hirvió en baño de agua durante 2 minutos. Después se añadieron 7 μ l de NP40 al 10% en urea 9 M, adsorbiéndose las muestras en tiras de papel Whatman MM de 5 x 10 mm y aplicándose a la placa como se describe más abajo.

La placa de acrilamida se cortó en fragmentos de tamaño conveniente, y se colocó sobre la placa refrigerante del aparato Multiphor. Se aplicaron a continuación dos tiras de papel de filtro empapadas en las soluciones de los electrodos (ánodo : PO_4H_3 1 M; cátodo : NaOH 1 M), y se conectó a una fuente de alimentación LKB, modelo 2103 a una potencia constante de 10 watios durante una hora para preformar el gradiente de pH. A continuación se desconectó la fuente y se aplicaron las muestras sobre la superficie del gel, absorbidas en fragmentos de papel de filtro. Seguidamente se volvió a conectar durante otras 2 horas, retirando los papeles de aplicación de las muestras a los 45 minutos.

El electroenfoque se llevó a cabo a una temperatura de 15-18°C, utilizando un circuito de refrigeración por agua, proporcionado por un baño termostatisado Lauda. Al comienzo del proceso, el voltaje y la

intensidad fueron de 300 V y 35 mA, respectivamente, que fueron variando a lo largo del proceso, siendo al final del mismo, de 1400 v y 7 mA.

Concluido el electroenfoque y con el fin de determinar el gradiente de pH de la placa, se cortó una tira de 10 mm de ancho, en sentido longitudinal y adyacente al lugar de aplicación de las muestras, seccionándose en fracciones de 5 mm que se colocaron en viales de vidrio conteniendo 1 ml de agua destilada libre de CO₂. Los viales se incubaron con agitación lenta durante la noche en un agitador New Brunswick, determinándose el pH con un pHmetro Radiometer.

El resto de la placa de acrilamida se tiñó durante una hora a 60°C con una solución preparada el mismo día que contenía 0,75 g de azul de Coomassie R-250, 225 ml de metanol, 22.5 g de ácido sulfosalicílico, 75 g de TCA, y 465 ml de agua destilada, y se destiñó a continuación a 37°C con una solución de agua-metanol-acético (3:3:1) durante 24 horas.

4.- Peso molecular de la proteína 8 en estado nativo.

El estudio del peso molecular de la proteína 8 de NIL-HSV en condiciones no disociantes se hizo por dos métodos diferentes : por filtración en gel (biogel P-200) calibrando con proteínas de peso molecular conocido y por centrifugación analítica.

a) Filtración en gel

Una suspensión de Biogel P-200 (BioRad, 100-200 mesh) en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5, previamente hidratada durante 48 horas, se empaquetó en una columna de vidrio de 0,9 x 60 cm. Esta columna se calibró con proteínas de peso molecular conocido, y a continuación se cromatografió una alícuota de proteína 8 purificada marcada radiactivamente (8,5 µg, 1880 cpm/µg) en un volumen de 0,2 ml del tampón de equilibrio de la columna, recogiendo fracciones de 0,25 ml con un colector de fracciones Buchler.

La posición de los marcadores se determinó midiendo la absorción a 280 nm. El volumen excluido se midió cromatografiando una alícuota del bacteriófago Ø29 purificado, siguiendo su absorción a 260 nm, y

se tomó la mioglobina como marcador común a las distintas cromatografías, siguiendo su absorción a 420 nm. Tanto el empaquetamiento de la columna como las cromatografías se hicieron a temperatura ambiente (20-25°C) con un flujo constante determinado por una presión hidrostática de unos 20 cm de altura entre los niveles de entrada y salida del tampón.

Para determinar la posición de la proteína 8 radiactiva, se tomó una alícuota de 200 µl de cada fracción y se pipeteó en discos de papel de fibra de vidrio GF/A, midiéndose su radioactividad como se describió anteriormente.

Las proteínas marcadoras utilizadas fueron :

γ-globulina humana, 1 mg; seroalbúmina de bovino, 2 mg; ovoalbúmina, 1,5 mg, y mioglobina de esperma de ballena, 0,2 mg.

b) Ultracentrifugación analítica. Equilibrio de sedimentación de la P8.

Se utilizó el método de deplección en el menisco desarrollado por Yphantis (162), mediante el cual, al correr la ultracentrífuga analítica a una velocidad suficientemente alta, la región de la solución próxima al menisco (la parte mas cercana al

eje de giro) llega a estar libre de macromoléculas. El método ofrece las ventajas de requerir relativamente poco tiempo para alcanzar el equilibrio de se dimentación, poder utilizar pequeñas cantidades de proteína y no ser necesario determinar con precisión la concentración inicial de la solución.

Se empleó una célula de seis canales en el rotor AN-D de una ultracentrífuga analítica Beckman, modelo E, equipada con óptica de interferencia Rayleigh. Se tomaron fotografías a distintos tiempos y a distintas velocidades de centrifugación para comprobar que el equilibrio se había alcanzado. La medida de los desplazamientos de las franjas de interferencia se realizó utilizando un microcomparador Nikon. El desplazamiento de las franjas en sentido vertical es una medida directa del incremento en la concentración de proteína en el fondo de la célula (la parte más alejada del eje de giro).

Haciendo una representación gráfica de la dependencia del logaritmo de la concentración de proteína con respecto al radio de giro al cuadrado, se obtiene una recta si sólo hay una especie molecular presente, cuya pendiente se puede calcular por el método de los mínimos cuadrados.

La proteína 8 purificada se analizó a varias concentraciones y en dos tampones distintos : tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5 y tampón de lavado sin seroalbúmina diluído 5 veces ($TL^1/5$), para lo cual la proteína purificada se dializó extensamente contra estas soluciones tampón. El dializado se utilizó como referencia.

Para el cálculo del peso molecular fue necesario determinar el volumen específico parcial de la proteína 8, lo que se realizó por el método descrito por Cohn y Edsall (163) a partir de su composición en aminoácidos.

También se determinó la densidad de los tampones utilizados, empleando para ello un densímetro Anton Paar. La medida se hizo a distintas temperaturas, con lo que se confeccionaron rectas de calibración a partir de las cuales se extrapolaron las densidades a las temperaturas en que se efectuaron las carreras.

El cálculo del peso molecular se hizo aplicando la fórmula convencional para los estudios de equilibrio de sedimentación en la ultracentrífuga analí-

tica (164) :

$$M = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \times \frac{2.303 (d \log C)}{d(r^2)},$$

en donde M es el peso molecular aparente del soluto; R es la constante de las gases; T es la temperatura absoluta a la que se hizo la carrera; \bar{v} es el volumen específico parcial del soluto; ρ es la densidad de la solución; ω es la velocidad angular de la carrera, y el término $\frac{d \log C}{d(r^2)}$ representa el incremento de la concentración de soluto en cualquier distancia radial.

En el método de Yphantis de depleción en el menisco, este último término se puede sustituir por $\frac{\log [Y(r) - Y_0]}{r^2}$, en donde $Y(r)$ es el desplazamiento vertical de las franjas de interferencia y Y_0 es la media de los valores de una franja cualquiera en la parte lineal de la misma, es decir, en la parte más cercana al menisco, en donde la concentración de proteína es prácticamente cero, ya que el término

$[Y(r) - Y_0]$ es proporcional a la concentración

de soluto y, por lo tanto, la pendiente de la gráfica en cualquier punto radial es proporcional al peso molecular aparente de la proteína.

5.- Método de tinción para glicoproteínas (PAS).

Para averiguar si la proteína 8 es una glicoproteína, se utilizó el método de tinción por el reactivo de Schiff después de tratamiento de la proteína con ácido periódico.(165).

Para ello, alícuotas de 30 µg de P8 y de γ -globulina, ovoalbúmina, láctico deshidrogenasa y seroalbúmina libre de lípidos se sometieron a electroforesis en presencia de SDS como se ha descrito anteriormente (sistema de Davis y Ornstein). Una vez concluida la electroforesis, los geles se tiñeron bien con Coomassie G-250 por el método habitual ya descrito, o bien se procesaron para tinción de glicoproteínas como se detalla a continuación:

Se fijaron los geles con metanol-acético-agua (5:1:5) durante la noche. A continuación se trataron durante 50 minutos a temperatura ambiente con una solución que contenía ácido periódico al 1% y ácido

acético al 3%, lavándose acto seguido con agua destilada seis veces durante 20 minutos cada una con agitación en matraces Erlenmeyer. Los geles así lavados se tiñeron durante 12 horas a temperatura ambiente con unos 20 ml de reactivo de Schiff (Metabisulfito 0,8% (P/V); ClH 1,05% (V/V); Fucsina 0,4%) (165).

A continuación se lavaron tres veces con metabisulfito potásico 0,025 N durante 10 minutos, y se destiñeron en matraces de 250 ml con varios cambios de una solución de metanol-acético-agua (8:1:11).

Por este sistema, las glicoproteínas aparecen teñidas de color rosado-anaranjado, mientras que las proteínas que no contienen cantidades apreciables de hidratos de carbono (menos del 1% en peso) no se tiñen.

D) INTERACCION DE LA PROTEINA 8 CON EL DNA.

1.- Unión de la proteína 8 purificada a columnas de DNA-celulosa.

Para comprobar si la proteína 8 una vez purificada conserva su capacidad de unión a columnas de

de DNA-celulosa y si esta unión es específica, se empaquetaron dos columnas de un volumen de 0,2 ml en pipetas Pasteur, una de ellas con celulosa y la otra, con DNA-(desnaturalizado)-celulosa (2 mg de DNA/g de celulosa), equilibrándose con TL + SAB. A continuación se aplicaron a cada columna 8 µg de P8 radiactiva (1.300 cpm/µg) en 0,1 ml de TL + SAB, procediéndose como se describió anteriormente. Cada columna se lavó con 10 ml de TL + SAB y se eluyó con 8 ml de TL con ClNa 0,15 M. Se recogieron fracciones de 0,2 ml, determinándose la radiactividad como se ha descrito anteriormente.

2.- Interacción in vitro de la proteína 8 con el DNA: filtración por discos de nitrato de celulosa.

Para estudiar la unión de la proteína 8 a distintos tipos de ácidos nucleicos en solución, se utilizó una modificación de la técnica de filtración por discos de nitrato de celulosa de Jones y Berg (166), que permite detectar el complejo formado entre el ácido nucleico y la proteína. Esta modificación consistió en añadir dimetilsulfóxido al 1% en el tampón de tratamiento de los discos, con lo que el fondo debido al

DNA no unido a proteína retenido en el filtro disminuye apreciablemente (166).

a) Unión de la proteína 8 a DNA homólogo y heterólogo.

Para estudiar la interacción de la proteína 8 a DNA de diversos orígenes, se incubaron a 30°C durante 5 minutos (posteriormente se comprobó que con un tiempo menor de incubación se obtienen idénticos resultados) cantidades crecientes de proteína 8 con una cantidad fija del ácido nucleico a estudiar marcado radiactivamente, en un volumen de 0,1 ml de TL con ClNa 0,09 M. Al final de la incubación, se diluyeron las muestras con 1 ml de TL, filtrándose inmediatamente por discos de nitrocelulosa (Millipore HAWPQ 2500, de 25 mm de diámetro) previamente hervidos en agua destilada durante 20 minutos y sumergidos en TL con dimetil sulfoxido al 1%. La filtración se llevó a cabo a una presión negativa de unos 5-10 cm de Hg con lo que el flujo de filtración no sobrepasó nunca los 5 ml/minuto. Los discos se lavaron dos veces con 3-5 ml de TL (también se comprobó posterior

mente que no era necesario un lavado tan extenso) y se secaron a continuación durante una hora bajo lámpara de rayos infrarrojos. Después de añadir líquido de centelleo, la radiactividad se determinó como se describió anteriormente. Como controles, se llevaron incubaciones en paralelo con RNA-polimerasa purificada de B. subtilis y seroalbúmina de bovino.

Se utilizaron dos tipos de DNA : DNA homólogo de NIL-HSV marcado con tritio y preparado según se describe en el apartado correspondiente, y DNA heterólogo del bacteriófago ø29 marcado con P^{32} o C^{14} .

b) Efecto de la fuerza iónica y de la temperatura sobre la interacción in vitro de la P8 con el DNA desnaturalizado.

El efecto de la fuerza iónica y de la temperatura se estudió incubando una cantidad fija de DNA desnaturalizado de NIL-HSV y de proteína 8 en 0,1 ml de TL que contenía ClNa a distintas concentraciones. La dilución de las muestras y el lavado de los filtros se hizo con TL que contenía ClNa a la misma concentración que la mezcla de incubación. La temperatura de in

cubación fue de 30°C ó 0°C, lavándose en cada caso con el tampón correspondiente a la misma temperatura.

c) Efecto de cationes divalentes sobre la interacción in vitro de la P8 con el DNA desnaturalizado de NIL-HSV.

Para estudiar el efecto del Mg^{++} y Mn^{++} se procedió de idéntica manera a la descrita anteriormente, incubando cantidades fijas de proteína 8 y DNA desnaturalizado de NIL-HSV marcado con tritio en 0,1 ml de TL con ClNa 0,09 M y concentraciones crecientes de uno u otro catión. El efecto del Mg^{++} se estudió también incubando una cantidad fija de DNA con cantidades crecientes de P8 en TL con ClNa 0,09 M en presencia o ausencia de Cl_2Mg 10 mM.

d) Efecto del tamaño del DNA sobre la interacción P8-DNA desnaturalizado.

El DNA- C^{14} nativo de NIL-HSV (0,1 mg/ml) se sonificó en un volumen de 1,5 ml de SSC 0,1 x durante 1 minuto con pulsos de 10 segundos y a una amplitud de oscilación de siete micras utilizando un sonicador MSE, y

manteniendo la solución en baño de hielo.

El DNA sonificado se desnaturalizó por calor, incubándose a continuación 10 µg de P8 con 1 µg de las distintas fracciones de DNA en 75 µl de TL con ClNa 75 mM a 30°C y durante 5 minutos, procesándose a continuación como se ha descrito anteriormente.

El tamaño del DNA antes y después de sonicar se calculó de forma aproximada por electroforesis en gel de agarosa (ver más adelante en el apartado de ensayo de endonucleasas) utilizando los fragmentos de digestión del DNA de Ø29 por la endonucleasa de restricción EcoRI.

e) Curva de concentración de DNA desnaturalizado.

Se incubaron en 75 µl de una mezcla de reacción que contenía 30 µl de SSC 0,1 x, 30 µl de TL con ClNa 0,15 M y 15 µl de TL^{1/5} (concentración final de ClNa 68 mM), 5, 10 o 15 µg de P8 con cantidades crecientes de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de Ø29. La incubación se efectuó a 30°C durante 5 minutos, y a continuación se filtraron las muestras como se ha descrito

anteriormente, lavándose los filtros con 1 ml de la mezcla de reacción.

f) Unión de la proteína 8 a poli(dA-dT), poliA, y RNA homólogo.

Se incubaron a 30°C durante 5 minutos cantidades crecientes de proteína 8 con una cantidad fija de poli (dA-dT)-H³ desnaturalizado por calor (1,2 µg, 21.6000 cpm/µg), poli A-C¹⁴ (1,3 µg; 2.000 cpm/µg), o RNA-H³ de NIL-HSV (4,3 µg; 1.580 cpm/µg), en un volumen de 75 µl de una mezcla de reacción que contenía 45 µl de TL^{1/5}, 10 µl de TL, 10 µl de TL con ClNa 0,1 M y 10 µl de SSC 0,1x (concentración final de ClNa 28 mM). Las mezclas de incubación se filtraron de la forma habitual.

3.- Precipitación del complejo DNA(desnaturalizado)-P8.

Cantidades fijas de proteína 8 y DNA desnaturalizado de NIL-HSV marcado radiactivamente, en 0,1 ml de TL que contenía distintas concentraciones de ClNa, se incubaron a varias temperaturas durante 5 minutos, en tubos cónicos de 1 ml de la casa Sorvall. A conti-

nuación se centrifugaron los tubos en el rotor SS-34 de una centrífuga Sorvall a 8.000 rpm durante 10 minutos, a la misma temperatura que se realizó la incubación. Seguidamente, se retiró el sobrenadante con una micropipeta teniendo cuidado de no remover el sedimento y se adsorbió en discos de fibra de vidrio GF/A.

A los sedimentos se añadieron 100 μ l de una solución igual al tampón de incubación, con SDS al 1%, calentándose 2 minutos para disolver el sedimento. A continuación, se tomó todo el volumen con una micropipeta y se adsorbió en papeles GF/A. Después de secar durante una hora a 100°C, se añadió líquido de centelleo y se determinó la radiactividad.

4.- Estequiometría de la unión de la proteína 8 al DNA desnaturalizado.

Para calcular la cantidad de proteína 8 fijada al complejo insoluble P8-DNA desnaturalizado, se emplearon dos sistemas distintos dependiendo de que la proteína estuviese marcada radiactivamente, o no.

a) Unión de la proteína 8 radiactiva a DNA desnaturalizado.

Se incubaron a 30°C durante 5 minutos en tubos cónicos de 1 ml, 3,8 µg de DNA-C¹⁴ de NIL-HSV desnaturalizado (985 cpm/µg), con 1,7 µg de P8-H³ purificada (1.800 cpm/µg) diluida con cantidades crecientes de proteína 8 fría, en un volumen de 75 µl de una mezcla de reacción que contenía 20 µl de SSC 0,1x, 30 µl de TL con ClNa 0,15 M, 20 µl de TL^{1/5} y 5 µl de TL con ClNa 0,1 M (concentración final de ClNa : 73 mM). Después de la incubación, se centrifugaron los tubos y se determinó la radiactividad en los sedimentos y en los sobrenadantes, como se describe en el apartado anterior, aplicando en este caso condiciones de conteo para doble marca.

b) Unión de la proteína 8 fría a DNA desnaturalizado.

Se procedió de idéntica manera, incubando 4,2 µg de DNA-C¹⁴ de NIL-HSV desnaturalizado (18.000 cpm/µg) con cantidades crecientes de proteína 8 fría. Se

centrifugaron los tubos y se retiraron los sobrenadantes, que se depositaron en tubos limpios.

A los sedimentos se añadieron 100 μ l de un tampón de ruptura que contenía tampón de incubación idéntico al descrito en el apartado anterior, con SDS al 1%; 2-mercaptoetanol 1%; sacarosa 5% y azul de bromofenol 8 μ g/ml. A los sobrenadantes se añadieron 25 μ l de tampón de ruptura 4 x (tampón de incubación con SDS 4%, 2-mercaptoetanol 4%, sacarosa 20% y azul de bromofenol 32 μ g/ml). Después de calentar 2 minutos a 100°C, se tomaron alícuotas de 5 μ l que se adsorbieron en discos de papel de fibra de vidrio GF/A, determinándose la radiactividad debida al DNA-C¹⁴ en la forma habitual. El volumen restante de cada muestra se sometió a electroforesis en placa de poliacrilamida, utilizando el sistema de Ornstein y Davis, ya descrito.

Las placas se polimerizaron en una cubeta de electroforesis de Hoeffer Scientific Instruments, modelo SE-500 con un grosor de 3 mm, y la electroforesis se llevó a cabo durante unas dos horas y media, aplicando un voltaje inicial de 100 voltios, que dió

una intensidad de 150 mA.

Se llevaron en paralelo varios puntos con cantidades conocidas de P8, que se utilizaron para confeccionar una curva de calibración.

Una vez concluida la electroforesis, se tñeron las placas con azul de Coomassie G-250 en metanol-acético-agua (5:1:5) durante la noche, con agitación, destiñéndose a continuación con acético al 7%, con varios cambios.

La determinación de la cantidad de proteína se hizo bien por densitometría de las bandas con un espectrofotómetro Gilford 2400 y comparación de las áreas de cada pico con la curva de calibración obtenida con la proteína 8 (168) o bien por elución del colorante del gel con piridina, según el método descrito por Fenner et al (169).

En este último caso, se cortaron rectángulos del gel, comprendiendo las bandas de proteína y se homogeneizaron con un émbolo de teflon en un tubo de vidrio, que contenía volúmenes adecuados de piridina al 25%, dejándose después en tubos cónicos graduados de 15 ml de capacidad con agitación durante la noche.

Cuando el colorante quedó en equilibrio entre las partículas del gel y la solución de piridina, se determinó la absorción a 615 nm (máximo de absorción del azul de Coomassie G-250 en piridina al 25%), y, después de sustraer la absorción debida al fondo de tinción del gel sin proteína, se efectuó una curva de calibración a partir de las cantidades conocidas de proteína 8, que se utilizó para calcular la cantidad de proteína en las bandas correspondientes a los sobrenadantes o sedimentos obtenidos por centrifugación de las mezclas de incubación de la P8 con el DNA.

5.- Preparación del DNA de NIL-HSV radioactivo.

El DNA se extrajo de las células según el método de Marmur (170). Las células se cultivaron en botellas y se marcaron como se detalla en el apartado de cultivos radioactivos.

Después de retirar el medio y lavar 2 veces con 40 ml de PBS, por botella, se añadieron 15 ml de tampón de extracción con SDS (ClNa 0,15 M; EDTA 0,1 M, pH 8 y SDS al 2%), recogiénose el extracto viscoso en un matraz. A continuación se añadió per-

clorato sódico 5 M hasta una concentración final de 1 M, y se agitó durante unos minutos. Seguidamente se añadió un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (12:1) y se agitó suavemente por rotación del matraz durante 30 minutos. La solución se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recogió la fase superior acuosa, la cual se volvió a extraer con cloroformo-alcohol isoamílico, repitiéndose el proceso 2 veces más.

La solución acuosa final se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, recogiendo el DNA mediante una varilla de vidrio. El DNA se secó al aire, y se disolvió en un volumen adecuado de SSC 0,1 X durante la noche. Una vez disuelto se trató con 50 µg/ml de RNasa pancreática (preincubada a 80°C durante 30 minutos) durante 1 hora a 37°C. Después de este tratamiento, el DNA se desproteinizó por una nueva extracción con cloroformo-alcohol isoamílico, y se precipitó de nuevo con etanol absoluto, guardándose enrollado en la varilla de vidrio a -20°C.

Cuando se quiso utilizar, el DNA se disolvió en SSC 0,1 X, con unas gotas de cloroformo para evitar contaminación.

E) ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

1.- Ensayo de RNasa.

Se incubaron a 30°C 0,4 ml de TL que contenía 66 µg de RNA-H³ total de NIL-HSV con 0,1 ml bien de P8 purificada (0,5-0,9 mg/ml en TL con ClNa 0,1 M), o de RNasa pancreática (50 µg/ml en TL con ClNa 0,1 M y SAB 0,5 mg/ml) o bien de TL con ClNa 0,1 M. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 0,1 ml a las que se añadió, para detener la reacción, 0,4 ml de una solución que contenía acetato sódico al 2%, EDTA 10 mM y RNA de levadura (0,125 mg/ml). A continuación se añadió a cada alícuota 1,2 ml de etanol absoluto (preenfriado a -20°C), manteniéndolas a -20°C durante una hora. Después de centrifugar a 8.000 rpm durante 30 minutos y 0°C se recogió 1 ml del sobrenadante al que se añadió 10 ml de una solución de Bray compuesta de Naftaleno 60 g; PPO 4 g; POPOP 0,2 g; metanol absoluto 100 ml y etilen glicol 20 ml, en 1 litro de dioxano (171). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago.

El RNA total de NIL-HSV se aisló de células marcadas con uridina tritiada por el método del fenol caliente (172).

2.- Ensayo de DNasa (exonucleasa).

La mezcla de incubación contenía los siguientes componentes en un volumen final de 0,5 ml : Tris-ClH 50 mM, pH 7,9; glicerol 6%; ditiotreitól 3,75 mM; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 50 mM; Cl_2Mg 1,25 mM; Cl_2Mn 1,25 mM; ATP, CTP y GTP 0,25 mM; 30 μg de DNA- H^3 desnaturalizado de NIL-HSV (1630 cpm/ μg) y 0,1 ml de P8 (1 mg/ml en TL con ClNa 0,1 M), ó 0,1 ml de DNasa I pancreática (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en TL con ClNa 0,1 M) ó 0,1 ml de T1 con ClNa 0,1 M. La incubación se llevó a cabo a 37°C. Se tomaron a distintos tiempos alícuotas de 0,1 ml a las que se añadió para detener la reacción 0,4 ml de una solución que contenía acetato sódico al 0,2%, EDTA 10 mM y DNA de timo de ternera desnaturalizado (0,12 mg/ml), procesándose a continuación las muestras de igual manera que en el ensayo de RNasa.

3.- Ensayo de DNasa (endonucleasa).

Para la valoración de actividad endonucleasa se utilizó un método cualitativo en el que un DNA de

de etidio (5 µg/ml) durante media hora. Las zonas con DNA aparecen como manchas fluorescentes bajo luz ultravioleta.

4.- Ensayo de ATPasa

La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes en un volumen final de 0,15 ml :
0,1 ml de TL; Tris-ClH 40 mM, pH 7,8; ClK 50 mM; Cl₂Mg 12 mM; EDTA 0,125 mM; ditiotreitól 0,125 mM; SAB 2 mg/ml; 0,1 µmoles de ATP-γ-P³² y 15 µg de P8 purificada, ó 30 µg de las proteínas del pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (nativo)-celulosa, ó 200 µg de las proteínas no retenidas en la columna de DNA (desnaturalizado) - celulosa. La incubación se llevó a cabo a 37°C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 50 µl, a las que se añadió 1 ml de una solución que contenía carbón activo al 3%; SAB 0,15 mg/ml; fosfato potásico 1 mM, pH 7; pirofosfato sódico 0,1 mM y ClH 80 mM, manteniéndose 15 minutos en baño de hielo. A continuación se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se tomaron 0,25 ml del sobrenadante, que se depositaron en viales de vidrio. Se añadió 1,5 ml de una solución que contenía Tritón X-

100 al 33% en líquido de centelleo, determinándose la radiactividad en un contador Packard TriCarb.

Como controles, se llevaron incubaciones en paralelo sin proteína, que se procesaron de igual manera, así como alícuotas a las que no se añadió carbón activo antes de centrifugar.

F) ENSAYO DE UNION A COLCHICINA

Para ver si la P8 es tubulina, se probó su capacidad para fijar colchicina marcada radiactivamente, en las condiciones de ensayo utilizadas por Pastan para la tubulina de fibroblastos de la línea 3T3 (174), y utilizando el método de filtración en Sephadex G100 para la separación de la colchicina libre de la ligada a tubulina (175).

Se homogeneizó un cerebro de rata en 20 ml de un tampón que contenía fosfato sódico 1 mM, pH 7; Cl_2Mg 1 mM y sacarosa 0,33 M, con un homogeneizador Potter Elvehjem. A 1,5 ml del homogenado se añadió 0,75 ml de un tampón que contenía pirofosfato sódico 50 mM, pH 6,5; Cl_2Mg 2,5 mM y GTP 0,1 mM (tampón pi-

rofosfato). Se centrifugó a continuación a 14.000 rpm durante 30 minutos y a 0°C. El sobrenadante se dializó contra 500 ml de tampón pirofosfato, durante unas 4 horas en frío. Del dializado (4,2 mg/ml) se tomaron 200 µl, a los que se añadió 5 µCi de colchicina- H^3 (3 Ci/mmol) y 5 µl de colchicina fría 0,2 mM, incubándose a continuación durante 90 minutos a 37°C y en la oscuridad.

Al final de la incubación, la muestra se introdujo en una columna empaquetada con una suspensión de Sephadex G-100 (1 x 25 cm), equilibrada con tampón pirofosfato. La cromatografía se llevó a cabo a 4°C en un colector de fracciones refrigerado Isco, recogiendo fracciones de 0,8 ml.

Se procesó de igual manera 270 µg de P8 purificada, en 0,2 ml de $TL^1/5$, dializándose contra 200 ml de tampón pirofosfato e incubándose con colchicina- H^3 como se ha descrito anteriormente.

Se determinó la absorción a 280 nm de las fracciones de la cromatografía, y después se tomaron alícuotas de 200 µl de cada fracción, que se depositaron en viales de vidrio, añadiéndose 2 ml por vial de una

solución de Triton X-100 al 33% en líquido de centelleo. Finalmente, se determinó la radiactividad en un contador Nuclear Chicago.

RESULTADOS

A) PURIFICACION DE LA PROTEINA 8 DE CELULAS NIL-HSV.1) Cantidad de proteína en los extractos crudos de NIL-HSV.

En nuestras condiciones de cultivo a gran escala de fibroblastos transformados NIL-HSV, en las que se alcanza la confluencia al final del periodo de incubación, se obtienen unos 200 millones de células por botella. Por otro lado, la cantidad de proteína que se solubiliza en las condiciones de extracción utilizadas es de unos 35 mg por botella (Tabla I). Teniendo en cuenta que la proteína que permanece insoluble en esas condiciones es un 25% del total (176), se puede calcular la proteína total por célula, obteniéndose un valor de 200-250 picogramos.

2) Cromatografía en columnas de DNA-celulosa.

El método de purificación de la proteína 8 de la línea establecida NIL-HSV, se basa en el descrito por Tsai y Green (141) para la proteína 8 de la línea primaria SB de fibroblastos normales humanos. Dicho método utiliza la propiedad de la p8 de unirse específicamente a columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa y no a las de DNA nativo.

Tabla I. Cantidad de protefina soluble en extractos celulares de NIL-HSV en cultivo denso.

Preparación	Nº de botellas crecidas	mg de protefina extraída	mg de protefina por botella	Nº de células por botella
I	5	152	30	190×10^6
II	5	120	24	—
III	12	370	31	175×10^6
IV	7	165	23	—
V	10	230	23	—
VI	10	336	33	—
VII	15	440	29	—
VIII	25	599	24	—
IX*	5	100	20	—
X	40	1466	36	200×10^6
XI	32	1225	38	210×10^6
XII*	8	330	41	—
XIII	34	1400	41	—

Se cultivaron células de la línea NIL-HSV en botellas de 1 litro en un aparato rotatorio, con un cambio de medio. Al final de la incubación, se recogieron las células y se preparó el extracto celular como se describe en Métodos.

* : Cultivos radiactivos

El extracto celular crudo se pasó primero a través de una columna de DNA (nativo)-celulosa, en la cual quedan retenidas la mayor parte de las proteínas con afinidad por DNA-celulosa, mientras que la P8 pasa a través de ella, junto con el resto de las proteínas del extracto. A continuación, las fracciones del lavado de esta columna (que contiene la P8), se aplicaron a una segunda columna formada por DNA (desnaturalizado)-celulosa, eluyéndose las proteínas retenidas (entre las que se encuentra en forma mayoritaria la P8) con ClNa 0,15 M.

En las tablas II y III se muestra el porcentaje de la proteína aplicada a las columnas de DNA-celulosa que se eluye a ClNa 0,15 M, así como el tamaño de las columnas utilizadas en las distintas purificaciones.

El porcentaje de la proteína eluída con ClNa 0,15 M de las columnas de DNA (nativo)-celulosa varió entre un 2 y un 8%, con un valor medio de un 5% (Tabla II). Esta variabilidad parece ser debida a la distinta relación de proteína aplicada a DNA adsorbido en la columna que se utilizó en las diversas puri-

Tabla II. Purificación de la P8 de NIL-HSV.- Proteína retenida en las columnas de DNA (nativo)-celulosa.

Preparación	mg de proteína aplicados a la columna	Tamaño de la columna	Relación proteína aplicada/DNA en la columna	mg proteína en pico ClNa 0,15 M (%)
I	150	25 g (200 mg DNA)	0,75	3,6
II	100	"	0,5	6,7
III	100	"	0,5	6,4
IV	180	"	0,5	6,4
V	230	"	1,15	2,0
VI	200	25 g (200 mg DNA)	1,0	5,2
VII	440	"	2,2	—
VIII	400	25 g (125 mg DNA)	3,2	4,1
IX*	100	"	0,8	8,6
X	1200	"	9,7	3,3
XI	1200	55 g (340 mg DNA)	3,6	2,0
XII*	200	"	0,6	6,1
XIII	880	80 g (400 mg DNA)	4,5	4,5

Resumen de las cromatografías en columna de DNA(nativo)-celulosa de distintas purificaciones de P8. Se especifica el tamaño de la columna (g de celulosa y cantidad total de DNA fijado a la columna), y el porcentaje de proteína eluida con ClNa 0,15 M con respecto a la proteína total soluble aplicada.

*: Extractos radiactivos.

Tabla III. Purificación de la P8 de NIL-HSV.- Proteína retenida en las columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa.

Preparación	mg de proteína iniciales (a)	Tamaño de la columna	Relación proteína inicial/DNA en la columna	Proteína en pico de C1Na 0,15 M (%)
I	150	25 g(45 mg DNA)	3,3	2,7
II	100	"	2,2	3,0
III	100	"	2,2	2,5
IV	180	"	4,0	2,7
V	230	"	5,1	2,5
VI	200	"	4,4	2,3
VII	440	"	9,7	3,2
VIII	400	"	8,8	1,9
IX (b)	100	25 g(40 mg DNA)	2,5	2,8
X	1200	"	6,1 (e)	2,1 (c)
XI	1200	40 g(80 mg DNA)	7,5 (e)	1,6 (d)
XII (b)	200	"	2,5	3,1
XIII	880	"	5,5 (e)	2,2 (d)

Resumen de las cromatografías en columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa de distintas purificaciones de P8.

(a) Los valores se refieren a la cantidad inicial de proteína aplicada a la columna de DNA (nativo)-celulosa.

Tabla III. Continuación.

(b) Extractos radiactivos.

(c) Las fracciones del lavado de la columna de DNA(nativo)-celulosa se cromatografiaron 6 veces consecutivas en la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa indicada (ver tabla IV). El valor representado es la suma de los porcentajes de las sucesivas cromatografías, referidas a la cantidad inicial de protefna.

(d) Las fracciones del lavado de la columna de DNA(nativo)-celulosa se dividieron en dos partes iguales, cromatografiándose sucesivamente en la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa indicada. Los valores representan la suma de los porcentajes de las dos cromatografías, referidas a la cantidad inicial de protefna.

(e) Los valores indicados se calcularon teniendo en cuenta las condiciones descritas en los apartados (c) y (d), dividiendo la cantidad inicial de protefna por la cantidad de DNA presente en la columna, multiplicada por el número de veces que se utilizó.

ficaciones, ya que, de forma general, cuanto mayor es esta relación, menor es el porcentaje de proteína que se fija a la columna. Al mismo tiempo, otro factor que también puede influir en la disminución de dicho porcentaje es la pérdida de DNA adsorbido a las columnas a medida que son utilizadas (véase el apartado correspondiente de Métodos).

Por el contrario, el porcentaje de proteína eluída con ClNa 0,15 M de las columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa fue más reproducible, oscilando entre un 2 y 3% (Tabla III). La suma de los porcentajes en las dos columnas da un valor aproximado de un 7%, que coincide con el descrito por Salas y Green para fibroblastos de la línea 3T6 (140).

Cuando se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas presentes en el pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (nativo)-celulosa presentan una considerable variabilidad de unas cromatografías a otras, sobre todo en las proporciones relativas de las bandas, lo cual se puede relacionar con los porcentajes variables de proteína retenida en las distintas purificaciones. Sin embargo,

en ningún caso aparece entre ellas la P8, al menos en cantidades considerables (Figura 1).

Por otra parte, en el pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa, la P8 aparece como el componente mayoritario, acompañada por otras proteínas, la más abundante de las cuales es la proteína P8', de mayor movilidad que la P8 (Figura 2). La presencia de estas proteínas contaminantes en las fracciones de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa, puede deberse al hecho de que sean proteínas que tienen, como la P8, una afinidad específica por DNA (desnaturalizado)-celulosa, o bien a que sean proteínas que, aún teniendo afinidad por DNA (nativo)-celulosa pasan a través de la primera columna, por haberse saturado.

En la figura 3 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas eluidas con ClNa 2 M de las columnas de DNA (nativo y desnaturalizado)-celulosa de varias purificaciones de P8. Como puede verse, el perfil electroforético es muy complejo, con numerosas bandas de proteína, que muestran además una marcada variabilidad. Sin embargo, en ningún caso aparece una banda de movilidad similar a



Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas eluidas con ClNa 0,15 M de la columna de DNA(nativo)-celulosa de distintas purificaciones de proteína 8 de NIL-HSV.



Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas eluídas con ClNa 0,15 M de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa de distintas preparaciones.



Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de las proteínas eluidas con ClNa 2 M de la columna de DNA(nativo)-celulosa (A) y de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa (B), de varias purificaciones de proteína 8 de NIL-HSV.

la de la P8, al menos en cantidades considerables.

Teniendo en cuenta que la relación de proteína aplicada a DNA presente en las columnas de DNA (nativo)-celulosa parecía ser crítica, se estudió la capacidad de saturación de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa, con el fin de determinar las condiciones óptimas de fijación de la P8 a la misma.

Para ello, un extracto que contenía 1200 mg de proteína total, se pasó por una columna de DNA (nativo)-celulosa, y a continuación, el lavado de ésta se pasó varias veces por una columna constituida por DNA desnaturalizado, hasta que no se fijó más proteína, como se indica en la tabla IV. El valor obtenido para la saturación de la columna empleada fue de unos 6 mg de proteína, de los cuales un 70% es P8, calculado por densitometría del gel. Por lo tanto, en esas condiciones, una columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa formada por 25 g de celulosa y 40 mg de DNA se satura con unos 4 mg de P8, es decir, a una relación DNA/P8 de 10.

Tabla IV. Capacidad de saturación de la columna de DNA
(desnaturalizado)-celulosa.

mg de proteína en el extracto	nº de pases por columna	mg de proteína en pico de ClNa 0,15 M	%
1200	1	6,6	0,55
	2	5,8	0,48
	3	5,3	0,44
	4	4,9	0,40
	5	2,5	0,20
	6	0,5	0,04
Total :		25,6	2,11

La proteína no retenida en la columna de DNA(nativo)-celulosa de la preparación X se pasó por una columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa (25 g de celulosa; 40 mg de DNA totales), repitiéndose la cromatografía de la proteína no retenida en dicha columna las veces indicadas.

3) Cromatografía en columna de fosfocelulosa.

Tsai y Green obtuvieron la P8 de células SB en forma esencialmente homogénea mediante cromatografías secuenciales de la proteína del extracto celular en columnas de DNA (nativo)-celulosa y DNA (desnaturalizado)-celulosa. En nuestro caso, sin embargo, la P8 de NIL-HSV aparece todavía contaminada por otras proteínas después de la cromatografía sobre columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa.

Debido a ello, se dió un paso adicional de purificación, que consistió en una cromatografía sobre fosfocelulosa del pico de proteína eluido con ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa. Previamente fue necesario concentrar y dializar dicho pico de proteína. El rendimiento obtenido en esta concentración y diálisis posterior fue de un 70%. Con el paso de la fosfocelulosa se consiguió eliminar las proteínas contaminantes que acompañan a la P8, ya que ésta queda retenida débilmente en la columna de fosfocelulosa, eluyéndose con ClNa 0,1 M, mientras que las proteínas contaminantes o bien no se fijan a la columna, o bien quedan retenidas más fuertemente que la P8, eluyéndose con ClNa 2 M.

En la figura 4 se muestra el resultado de una cromatografía sobre fosfocelulosa de las fracciones

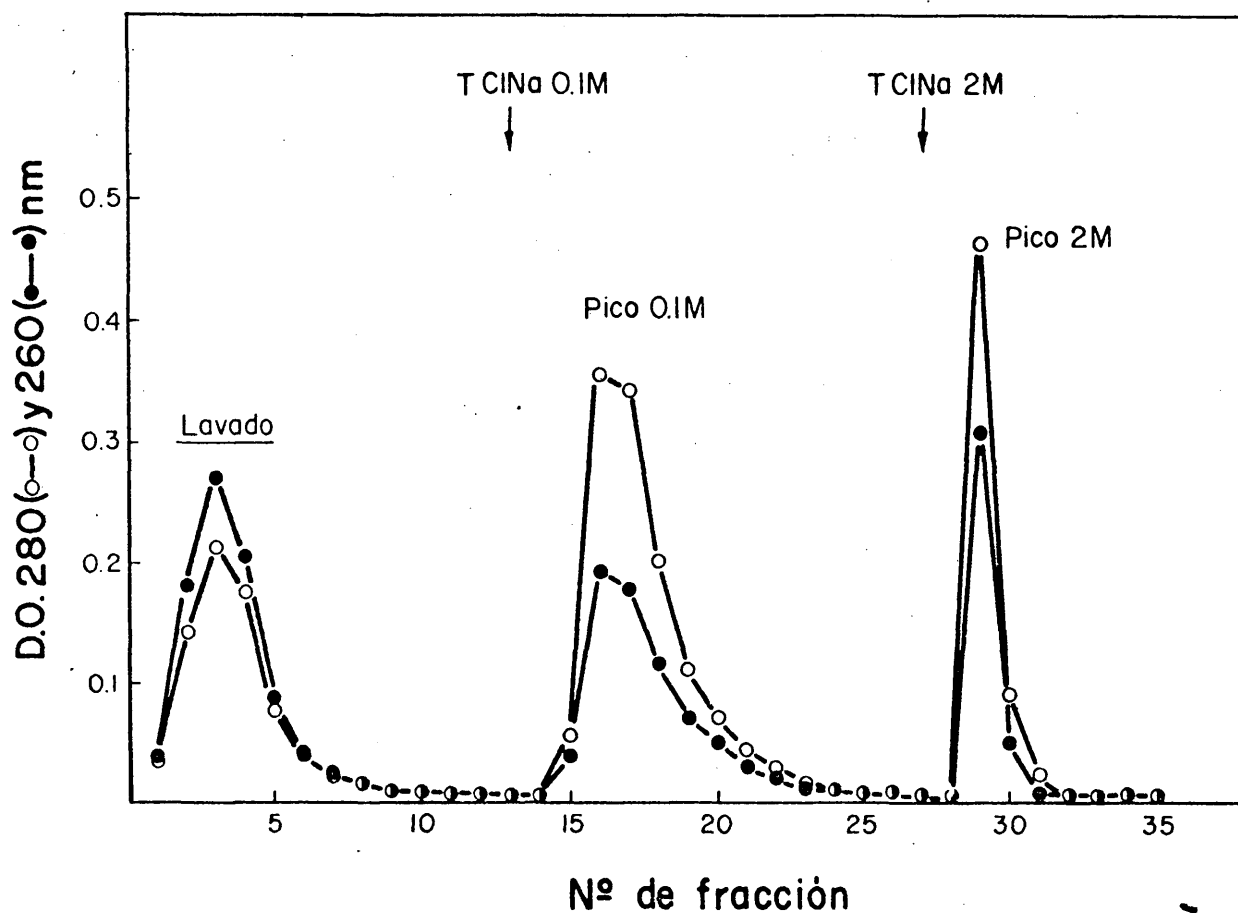


Figura 4. Cromatografía sobre fosfocelulosa del pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa. 4,6 mg de proteína se cromatografiaron en una columna de fosfocelulosa de 2 ml, con un flujo de 0,25 ml/minuto. Se recogieron fracciones de unos 2 ml, determinándose su absorción a 280 y 260 nm, como se describe en Métodos.

eluidas con ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa. Se observa un primer pico de absorción que corresponde a la proteína no retenida en la columna, un segundo pico de proteína que se eluye con ClNa 0,1 M, y un último pico eluido con ClNa 2 M. Es de destacar que por este procedimiento se elimina también la posible contaminación de la P8 por ácidos nucleicos (nótese la relación de absorción a 280 y 260 nm de los picos), que pudieran ser o bien DNA desprendido de las columnas de DNA-celulosa o bien RNA del extracto celular que acompañaría a las proteínas durante el proceso de purificación. (Hay que mencionar que el DNA endógeno del extracto se eliminó por tratamiento con DNasa).

En las figuras 5 y 6, se muestran las electroforesis en gel de poliacrilamida de las distintas etapas del proceso de purificación de la P8 de dos preparaciones distintas.

En la figura 7 se muestran las electroforesis de distintos preparados de P8 purificada. La proteína se obtiene en forma esencialmente homogénea, después de la cromatografía sobre fosfocelulosa. El grado de



Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las distintas etapas del proceso de purificación de la P8 de NIL-HSV (preparación IV).
a y b, picos de ClNa 0,15 M y 2 M, respectivamente, de la columna de DNA(nativo)-celulosa;
c y d, picos de ClNa 0,15 M y 2 M, respectivamente, de DNA(desnaturalizado)-celulosa; e, f y g, picos del lavado, ClNa 0,1 M y 2 M, respectivamente, de la columna de fosfocelulosa.

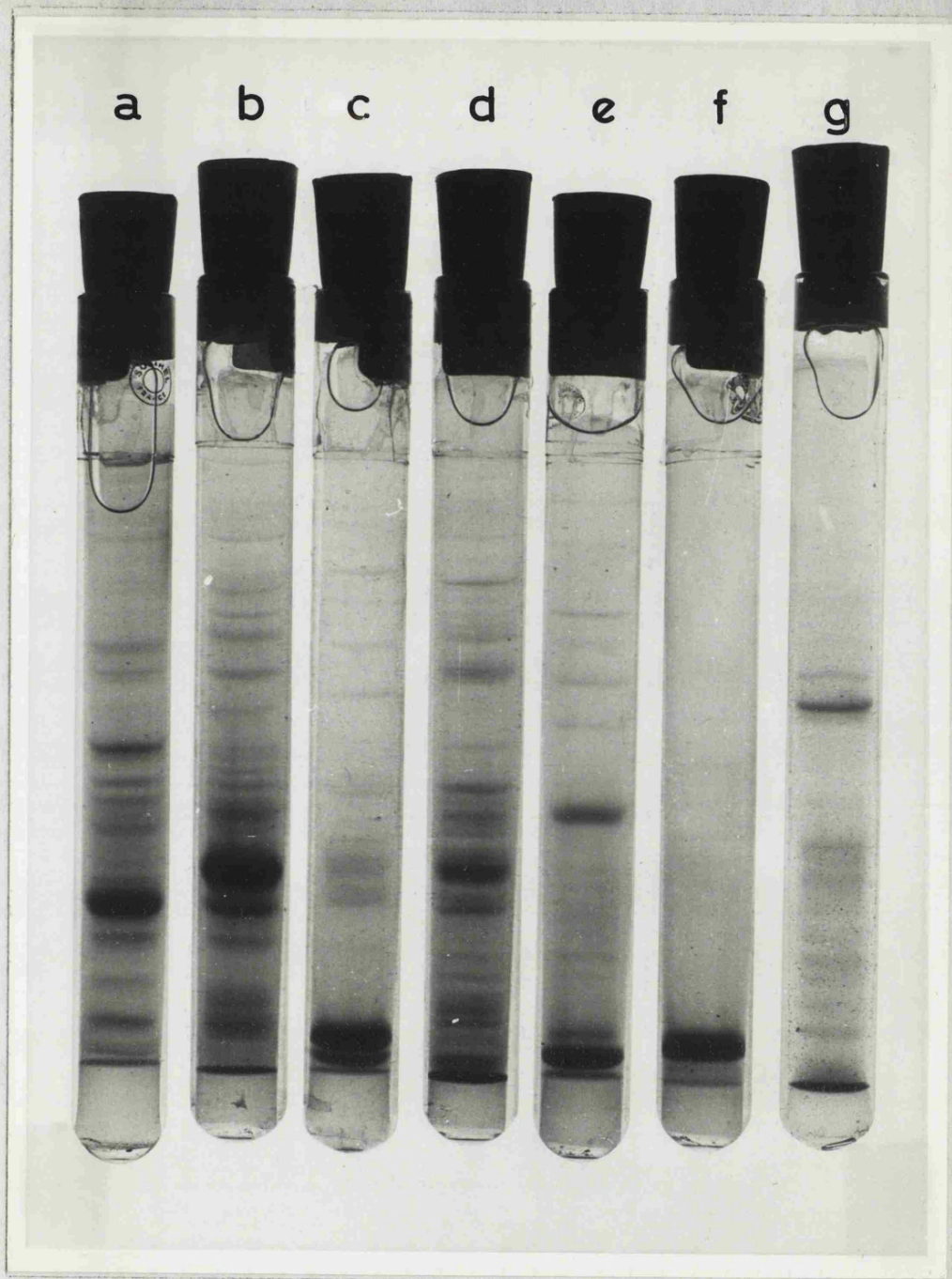


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las etapas del proceso de purificación de la P8 de la preparación XI. La nomenclatura es idéntica a la de la figura anterior.



Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la P8 purificada obtenida en distintas purificaciones.

pureza alcanzado, según el criterio de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, fue de un 95-100%, calculado por densitometría del gel (Figura 8).

En la tabla V se resume la cantidad final de P8 purificada obtenida en varias preparaciones. Como se puede observar, es posible obtener la P8 purificada en una cantidad que representa del 0,25 al 0,5% de la proteína total soluble del extracto celular. Por otro lado, se puede calcular el rendimiento del proceso de purificación de la P8 (suponiendo que toda la P8 presente en el extracto se fija a la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa) teniendo en cuenta la cantidad final de P8 purificada y la presente en los picos de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa. En la tabla VI se muestra el rendimiento conseguido en las sucesivas cromatografías de la preparación X, en donde la P8 representa un 70% de la proteína total de los picos de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa. Este rendimiento osciló entre un 20 y un 50%. Con estos datos, se puede calcular la cantidad de P8 presente en las células NI1-HSV en

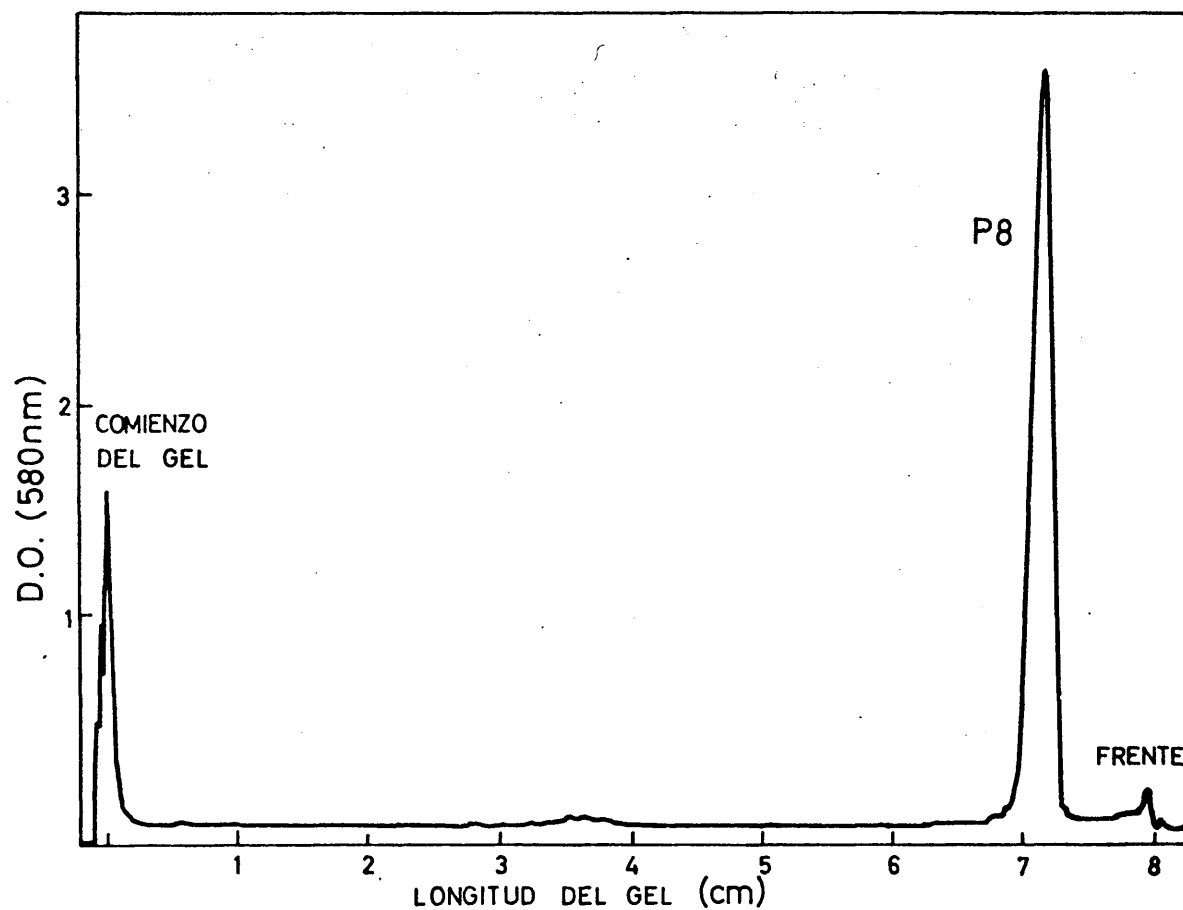


Figura 8. Densitograma de la P8 purificada.

El gel se tiñó con azul de Coomassie G-250 y se midió la densidad óptica a 580 nm como se indicó en Métodos.

Tabla V. Cantidad final de P8 obtenida en distintas preparaciones.

Preparación	mg de protefna en extracto	mg de P8 purificada	% de la protefna inicial
I	150	0,5	0,30
IV	180	0,42	0,23
V	230	0,95	0,41
VI	200	0,27	0,13
VII	440	2,0	0,45
IX	100	0,34	0,34
X	1200	6,34	0,52
XI	1200	5,74	0,47
XII	200	0,42	0,21
XIII	880	4,83	0,54

Tabla VI. Rendimiento del proceso de purificación de la P8 de NIL-HSV.

mg de proteína en pico de ClNa 0,15 M	mg de P8 purificada ^(a)	Rendimiento final de P8 (%) ^(b)
6,6	1,34	29
5,8	1,80	44
5,3	2,0	53
4,9	1,9	55
2,5	0,3	17
0,5	—	—
<hr/> Total 25,6	<hr/> 6,34	<hr/> 36 ^(c)

Los picos de proteína eluidos con ClNa 0,15 M de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa de la preparación X (ver tablas III y IV), se concentraron por ultrafiltración en membrana Diaflo y se dializaron contra TL, sometiéndose a cromatografía sobre fosfocelulosa como se describe en Métodos.

(a) Cantidad final de P8 purificada después de concentración del pico de ClNa 0,1 M de la cromatografía sobre fosfocelulosa.

(b) Suponiendo que la P8 constituye un 70% de la proteína total presente en cada pico.

(c) Porcentaje final de P8 calculado a partir de la cantidad total de P8 purificada, y la cantidad total de proteína de los picos de ClNa 0,15 M (excepto los 0,5 mg de la última cromatografía).

nuestras condiciones de incubación (cultivos densos). Este valor es superior al 1% de la proteína total soluble, es decir, se encuentran de 1,5 a 2 picogramos de P8 por célula (véase apartado A-1 de Resultados).

4) Purificación de la proteína 8 a partir de cultivos radioactivos.

También se purificó la P8 marcada radiativamente, para lo cual se incubaron las células en presencia de prolina tritiada como se describe en Métodos. En las figuras 9, 10 y 11, se muestran las electroforesis de las proteínas eluídas con ClNa 0,15 M de las columnas de DNA (nativo)-celulosa y DNA (desnaturalizado)-celulosa, y con ClNa 0,1 M de la columna de fosfocelulosa. Como se puede apreciar, los resultados son similares a los obtenidos con extractos no radiactivos, siendo el grado de pureza final de la P8 de prácticamente el 100%. La proteína radiactiva así purificada se utilizó en algunos estudios de sus propiedades físicoquímicas, tales como la determinación de su peso molecular en estado nativo y su interacción con el DNA.

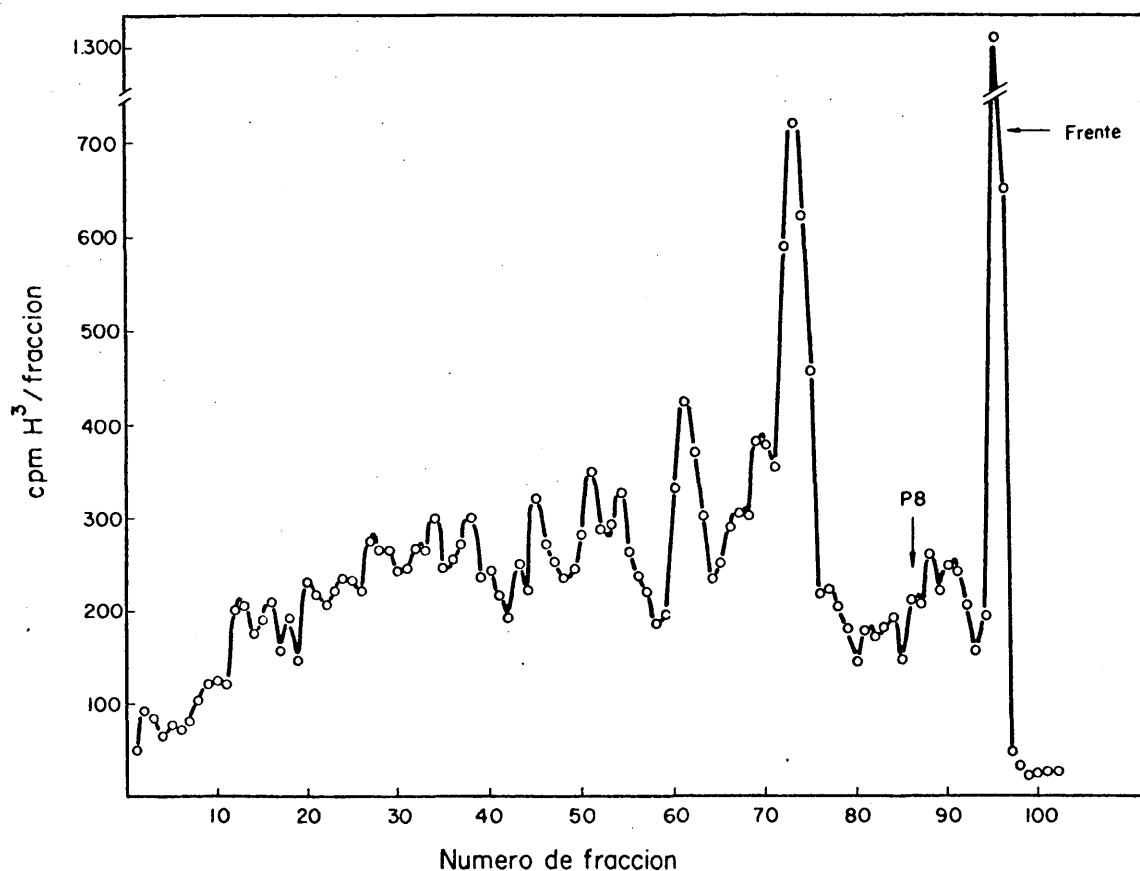


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas radiactivas eluidas con ClNa 0,15 M de la columna de DNA (nativo)-celulosa. Una alícuota del pico de ClNa 0,15 M de DNA nativo, conteniendo 58 µg de proteína radiactiva (1.300 cpm/µg), se sometió a electroforesis en presencia de SDS, como se describe en Métodos. (Recuperación 30%).

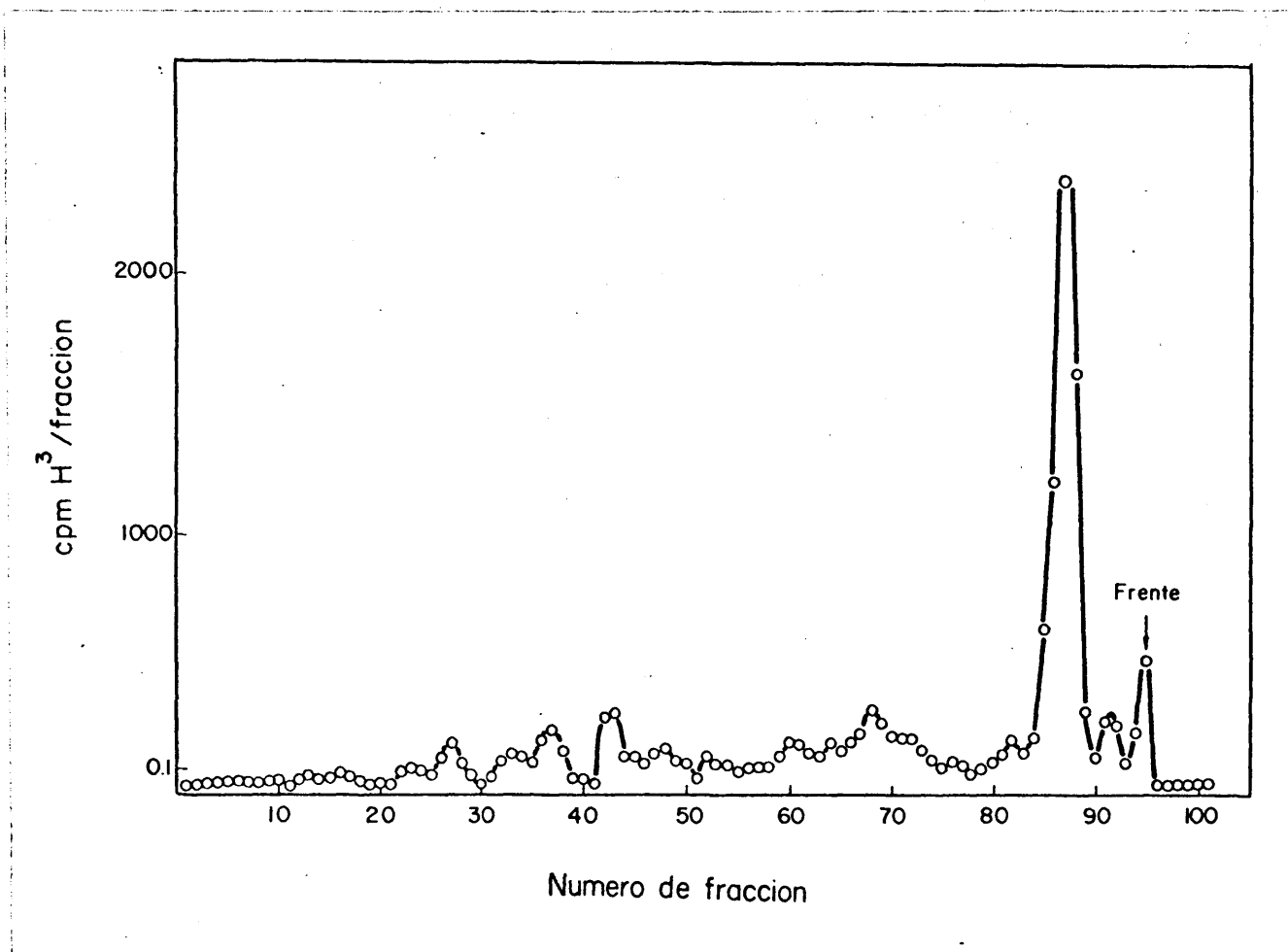


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas radiactivas eluidas con ClNa 0,15 M de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa. 25 μ g de proteína radiactiva (1.300 cpm/ μ g) se analizaron en las condiciones de la figura 9. La recuperación obtenida fue de un 46%.

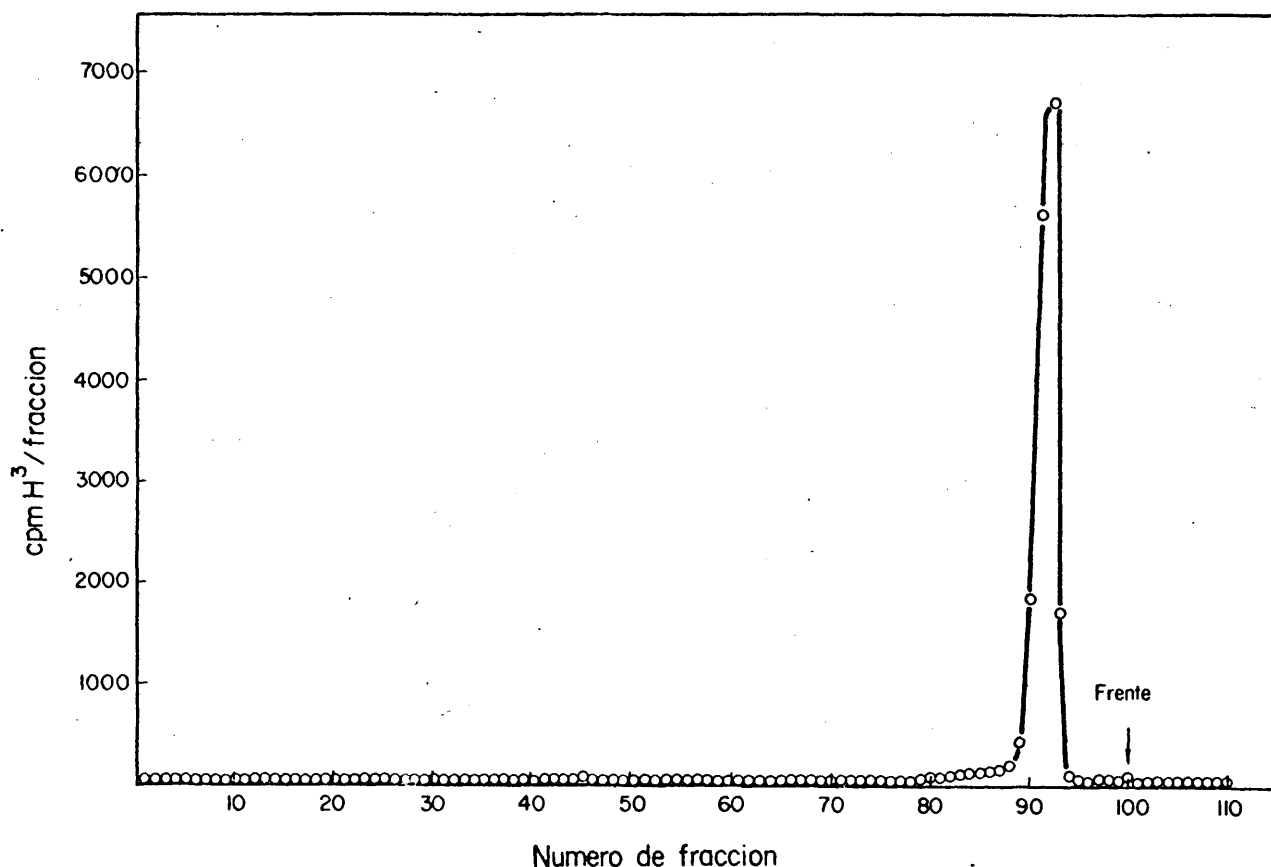


Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones eluídas con ClNa 0,1 M de la columna de fosfo celulosa.

Una alícuota de 14 μg de proteína radiactiva (1.300 cpm/ μg) se analizó en las condiciones de la figura 9. La recuperación obtenida fue de un 80%.

B) PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA PROTEINA 8 PURIFICADA.

1) Espectro de absorción ultravioleta.

En la figura 12 se representa el espectro de absorción ultravioleta de la proteína 8 purificada y dializada contra un tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. La P8 presenta un espectro de absorción en la región ultravioleta típico de una proteína libre de ácidos nucleicos, con un máximo de absorción a 282 nm y un mínimo a 254 nm, con una relación de $\frac{A_{282}}{A_{254}} = 2,3$ y de $\frac{A_{280}}{A_{260}} = 1,96$.

2) Peso molecular en presencia de SDS.

El peso molecular de la P8 en condiciones disociantes se estudió por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico en dos sistemas diferentes : el sistema de Davis y Ornstein (153), utilizado rutinariamente para el análisis de las proteínas en los distintos pasos del proceso de purificación, obteniéndose un valor de 35-36.000 daltones, y el sistema de Weber y Osborn (156), con el que se obtuvo un valor de 36-37.000 daltones (Figura 13).

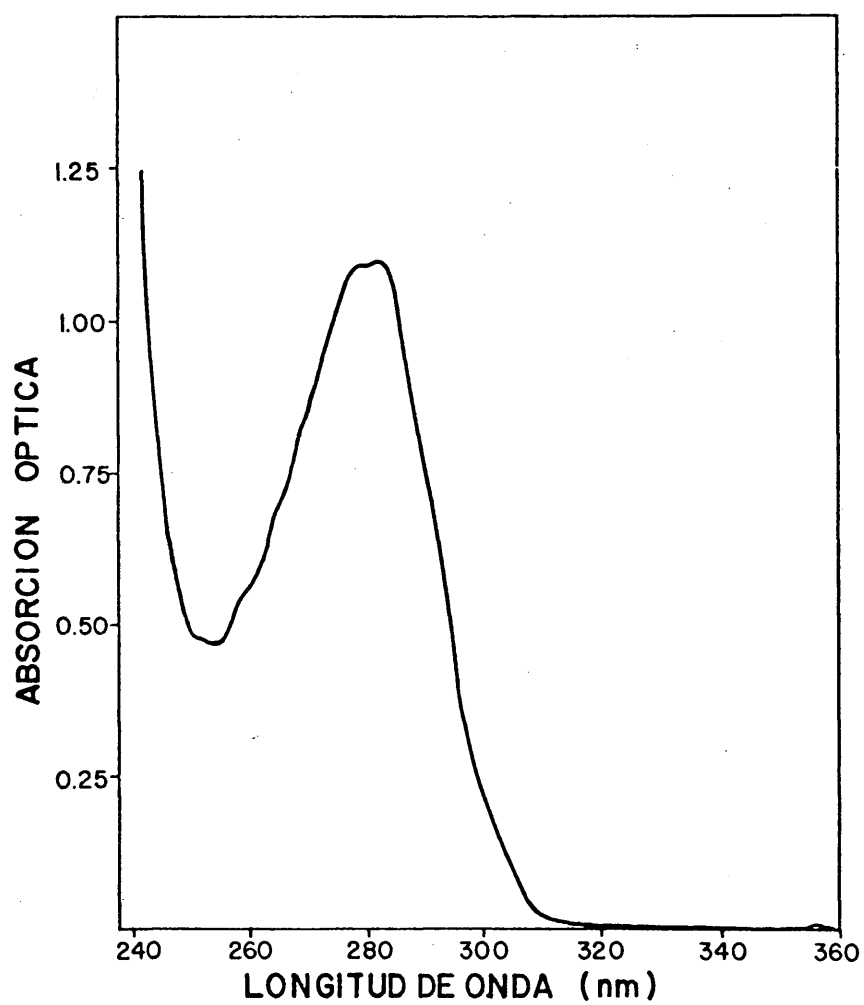


Figura 12. Espectro de absorción ultravioleta de la P8 purificada.

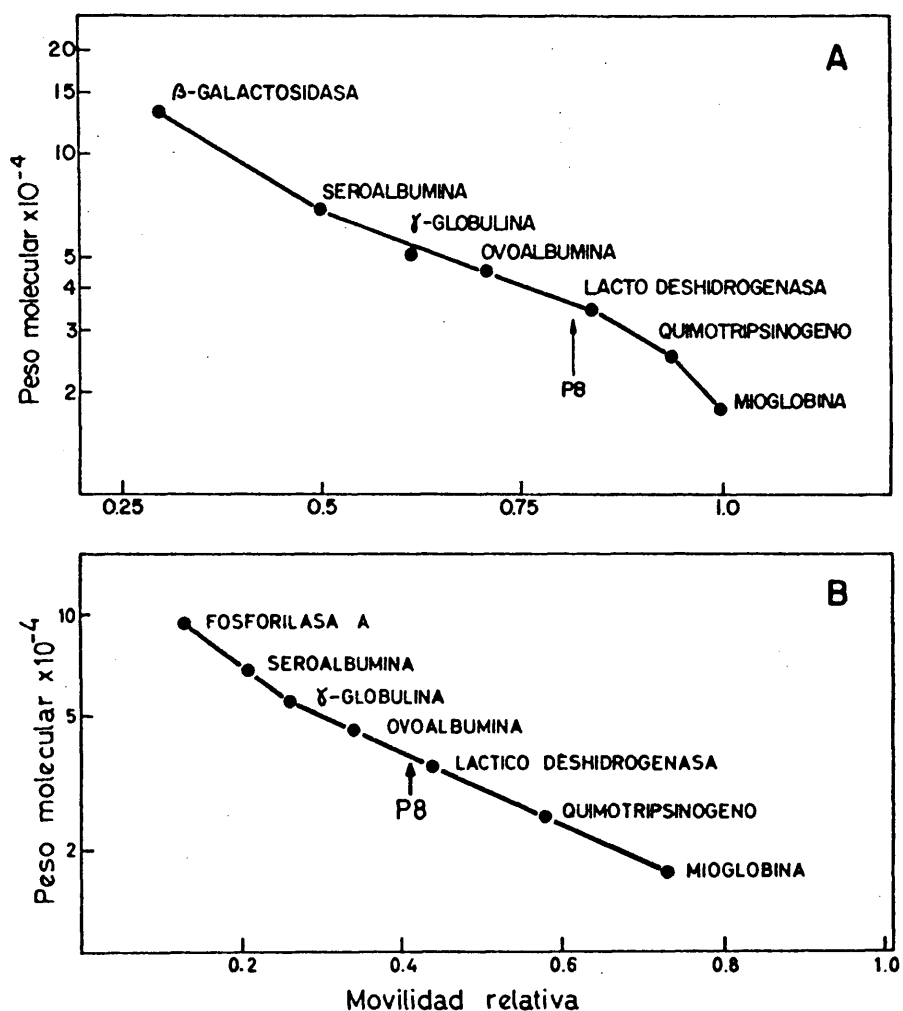


Figura 13. Determinación del peso molecular de la P8 por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Proteínas de peso molecular conocido se sometieron a electroforesis en presencia de SDS en dos sistemas distintos: A, sistema de Ornstein y Davis, y B, sistema de Weber y Osborn. La movilidad relativa de cada proteína se determinó frente al azul de bromofenol, confeccionándose curvas patrón, a partir de las cuales se determinó el peso molecular de la P8 en cada sistema.

3) Peso molecular en estado nativo

Por equilibrio de sedimentación en la ultracentrífuga analítica, la proteína 8 presenta un peso molecular aparente de 120.000 daltones \pm 5.000, en dos soluciones tampón diferentes : tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5 y TL 1/5. Este peso molecular se calculó por el método de depleción en el menisco.

En la tabla VII se muestra el valor calculado para el volumen específico parcial de la proteína 8 a partir de su composición en aminoácidos (ver más adelante), que se necesitó para el cálculo del peso molecular en la ultracentrífuga analítica.

En la figura 14 se muestra una representación gráfica de la dependencia del logaritmo de la concentración de proteína ($Y_{(r)} - Y_0$) con respecto al radio de giro al cuadrado, que, como se puede observar, es una recta con una sola pendiente, por lo que en principio se puede considerar que la P8 se encuentra, en las condiciones utilizadas en este experimento, como una sola forma molecular. En las demás condiciones estudiadas (distintas concentraciones de proteína, distintos tiempos de centrifugación y distintas velocidades) las gráficas correspondientes presentan idén

Tabla VII. Cálculo del volumen específico aparente de la P8
a partir de su composición en aminoácidos.

Residuo de aminoácido	W_i^a (% del residuo en peso)	V_i (volumen específico del residuo)	$V_i W_i$ (% por volumen de residuo)
Aspártico	12,87	0,60	7,722
Treonina	6,21	0,70	4,347
Serina	5,44	0,63	3,427
Glutámico	6,55	0,66	4,323
Prolina	4,77	0,76	3,625
Glicocola	10,44	0,67	6,681
Alanina	10,57	0,74	7,821
Valina	10,33	0,86	8,883
Cisteína	0,51 ^b	0,63	0,311
Metionina	1,52	0,75	1,140
Isoleucina	5,32	0,90	4,788
Leucina	5,00	0,90	4,500
Tirosina	3,30	0,71	2,343
Fenil alanina	4,85	0,77	3,734
Histidina	1,59	0,67	1,065
Lisina	6,77	0,82	5,551
Triptófano	1,10	0,74	0,814
Arginina	2,89	0,70	2,023
$\Sigma W_i = 100,03$			$\Sigma V_i W_i = 73,098$
$\Sigma V_i W_i / \Sigma W_i = V_p = 0,730 \text{ cc/g}$			

^a No se determinó el amoniaco

^b Determinado como media cistina. No se realizó oxidación con ácido
perfórmico.

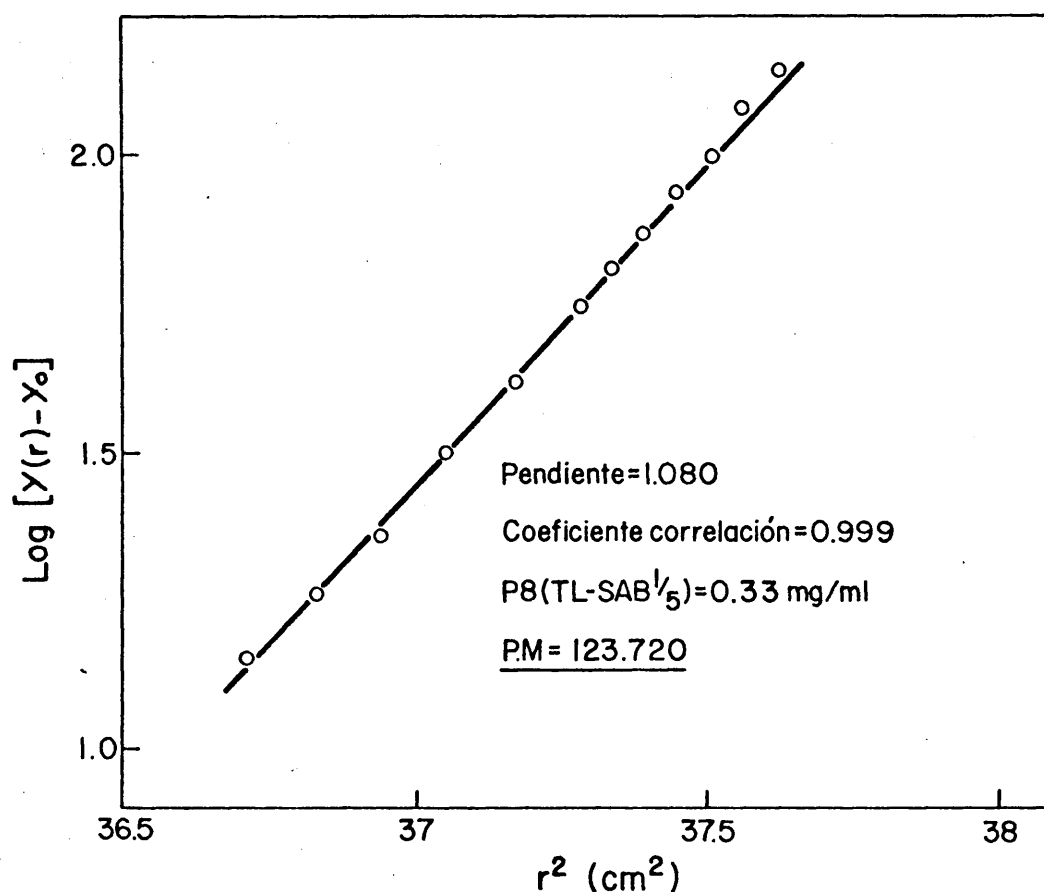


Figura 14. Determinación del peso molecular de la P8 de NIL-HSV por equilibrio de sedimentación.
 Una alícuota de P8 purificada, en TL $1/5$, a una concentración de 0,33 mg/ml se centrifugó a 18.000 rpm y 14,6°C en una célula de 6 canales en el rotor AN-D de una ultracentrífuga analítica Beckman, modelo E, tomándose fotografías con óptica de interferencia a las 24 horas.

tico aspecto.

En la tabla VIII se resumen los valores obtenidos en las diferentes condiciones estudiadas.

Por otra parte, por cromatografía en columna de Biogel P-200, la proteína 8 radiactiva aparece como un pico único y simétrico correspondiente a un peso molecular aparente de 120-125.000 daltones en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5, suponiendo que la P8 presenta una forma molecular similar a la de los marcadores utilizados (Figura 15). El mismo resultado se obtiene cuando la proteína 8 se cromatografía en el mismo tampón conteniendo ClNa 1 M (Figura 16). Estos resultados indican que la P8 presenta, en estado nativo, una estructura oligomérica constituida probablemente por cuatro subunidades o monómeros.

4) Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la proteína 8 purificada, de NIL-HSV, después de hidrólisis con ácido para-toluen-sulfónico, se muestra en la tabla IX, en la que se comparan nuestros resultados con los obtenidos por Tsai y Green con la proteína 8 purificada a partir de la línea primaria SB de fibroblas-

Tabla VIII. Cálculo del peso molecular de la proteína 8 de NIL-HSV por equilibrio de sedimentación en la ultracentrífuga analítica.

Concentración	Tampón	Velocidad	Tiempo	Pendiente	Coefficiente correlación	Peso Molecular
0,38 mg/ml	Fosfato Na 0.1 M pH 7.5	20.000	17 hr	1.202	0.998	118.000
0,50 mg/ml	TL 1/5	20.000	17 hr	1.183	0.998	114.300
0,33 mg/ml	TL 1/5	18.000	18 hr	1.083	0.999	124.070
0,33 mg/ml	TL 1/5	18.000	24 hr	1.080	0.999	123.720
0,45 mg/ml	TL 1/5	18.000	24 hr	1.034	0.998	118.460
0,67 mg/ml	TL 1/5	18.000	18 hr	1.108	0.997	126.930
0.67 mg/ml	TL 1/5	18.000	24 hr	1.062	0.999	121.660

Peso molecular medio.....119.624

Resumen de las carreras en la ultracentrífuga analítica de distintas preparaciones de proteína 8 purificada de NIL-HSV. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

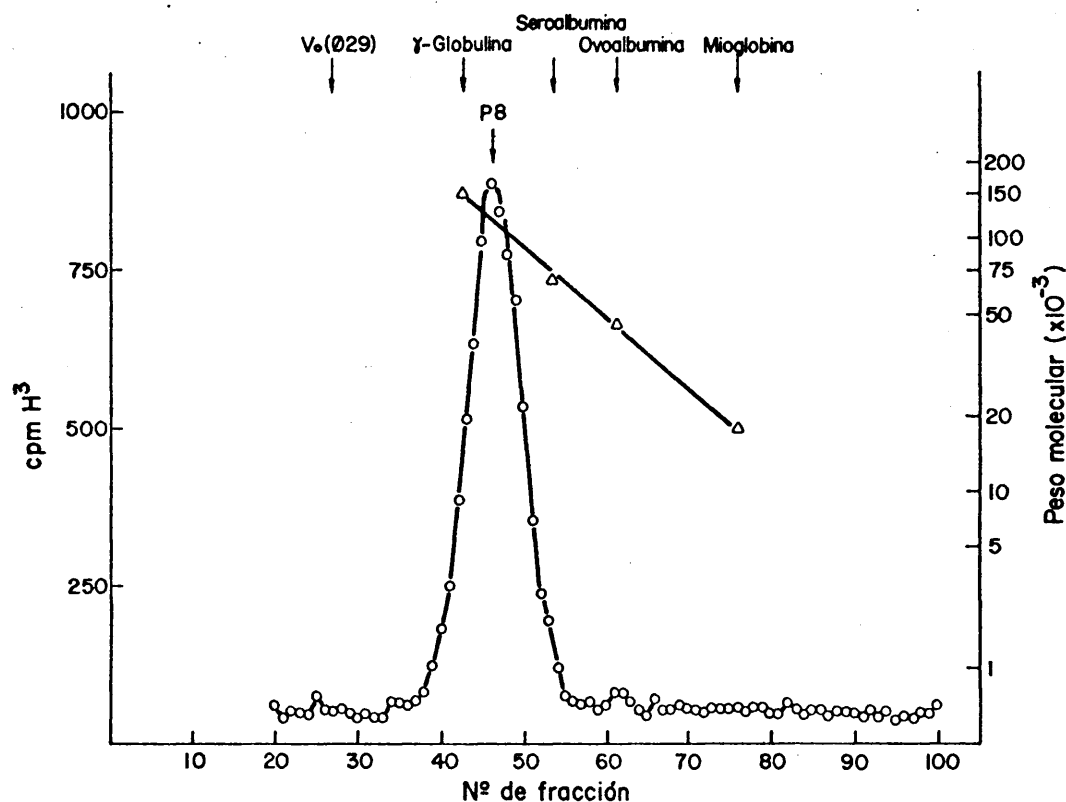


Figura 15. Determinación del peso molecular de la P8 de NIL-HSV por filtración en gel (Biogel-P-200).

Se cromatografió en una columna de Biogel P-200 de 0,9 x 50 cm una alícuota de P8 purificada radiactiva (8,5 µg, 1.880 cpm/µg) en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,5 a temperatura ambiente, recoigiéndose fracciones de 0,25 ml. Alícuotas de cada fracción se contaron por centelleo líquido, como se describe en Métodos. La columna se calibró con las proteínas marcadoras que se indican en la figura. El volumen excluido se determinó utilizando el fago Ø29.

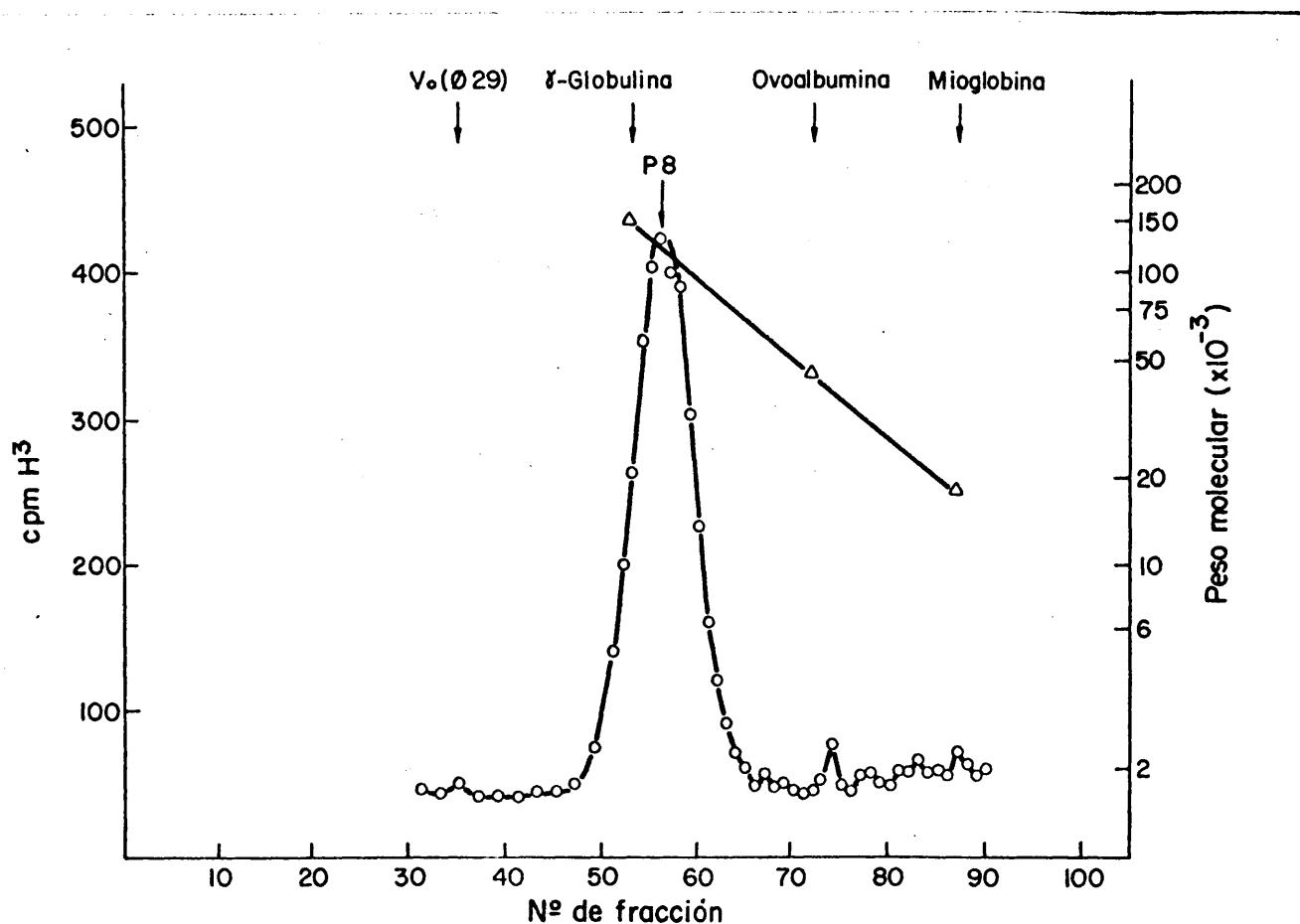


Figura 16. Peso molecular de la P8 de NIL-HSV por filtración en gel (Biogel P-200) en presencia de ClNa 1 M. Una alícuota de P8 purificada radiactiva (4,25 µg; 1880 cpm/µg se cromatografió en una columna de biogel P-200 en las mismas condiciones que se indican en la figura 15, excepto que el tampón fosfato contenía ClNa 1 M.

Tabla IX. Composición en aminoácidos de la proteína 8.

	NIL-HSV	SB
	nanomoles por 100	
Asp	12.87	13.22
Tre	6.21	6.18
Ser	5.44	7.21
Glu	6.55	6.33
Pro	4.77	4.57
Gli	10.44	9.99
Ala	10.57	10.95
Val	10.33	6.30
Cis	0.51	0.57
Met	1.52	1.53
Ile	5.32	4.26
Leu	5.00	6.73
Tir	3.30	2.16
Fen	4.85	4.99
His	1.59	3.17
Lis	6.77	8.66
Tri	1.10	----
Arg	2.89	3.54

Alícuotas de 30 µg de P8 purificada se hidrolizaron con ácido para-toluen-sulfónico, y se determinó la composición de aminoácidos con un analizador automático Durrum, como se describe en Métodos.

Los valores obtenidos para la P8 de NIL-HSV se comparan con los correspondientes a la P8 de SB (141).

tos normales humanos (141).

Como se puede ver, ambas determinaciones coinciden esencialmente. También es de destacar la presencia de cantidades apreciables de triptófano, lo cual excluye la posibilidad de que la proteína 8 sea una histona.

Por otro lado, se aprecia que la P8 es una proteína con mayor proporción de aminoácidos ácidos que básicos, siendo la relación de Aspártico + Glutámico / Lisina + Arginina + Histidina de 1,72.

5) Punto isoelectrico

Por electroenfoque de la proteína 8 en placa de acrilamida al 5% en presencia de urea 9 M aparecen dos bandas enfocadas a pH 7,8 y 8 (Figura 17). Teniendo en cuenta el hecho de que la urea aumenta apreciablemente el pH, y tomando como referencia las bandas de la hemoglobina que se llevó como control del experimento, los valores corregidos de las bandas correspondientes a la P8 son 7,5 y 7,7. Este resultado indica que la P8 tiene un punto isoelectrico ligeramente básico, de donde se puede deducir que la ma-

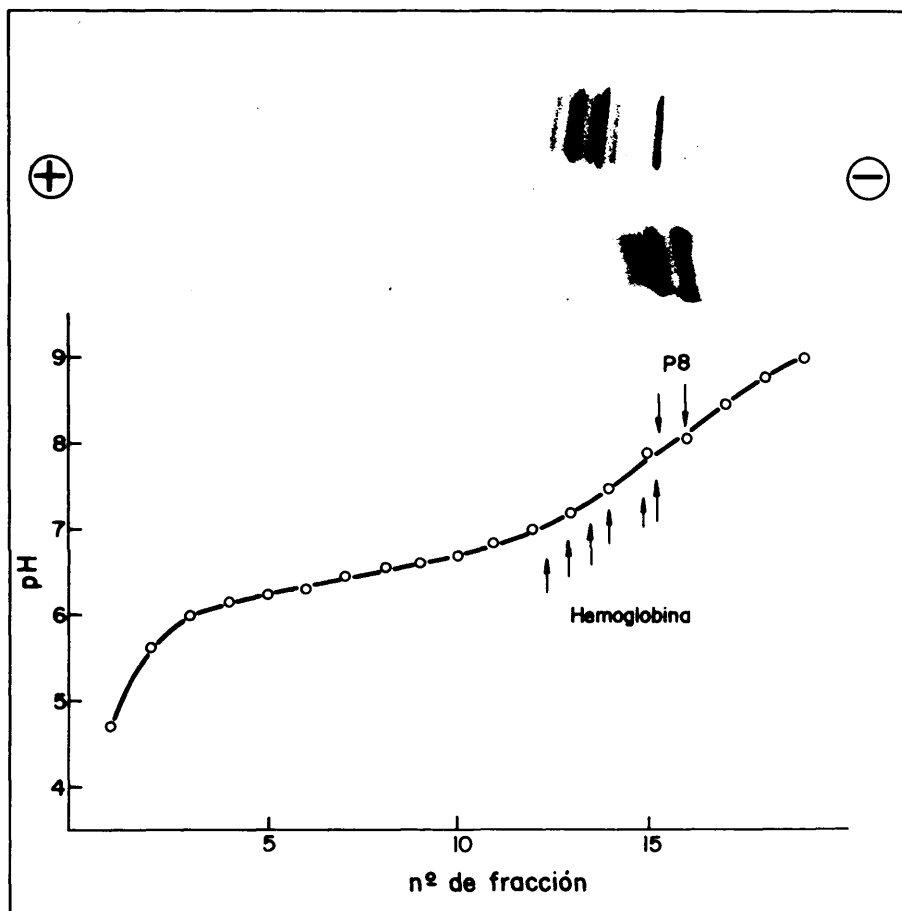


Figura 17. Punto isoeléctrico de la P8 de NIL-HSV.

Alícuotas de 25 µg de P8 purificada o de hemoglobina se sometieron a electroenfoque en placa de acrilamida como se describe en Métodos.

Gel superior, muestra de hemoglobina

Gel inferior, P8.

yor proporción de aminoácidos ácidos está contrarrestada al encontrarse un cierto número de ellos neutralizados por grupos amido.

6) Tinción para glicoproteínas

En la figura 18 se muestra el resultado de un experimento en el que la P8 purificada y varias proteínas patrón se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, tiñéndose a continuación por el sistema habitual (azul de Coomassie) y por el sistema de tinción de glicoproteínas (reacción de PAS). Como se puede observar, la P8 no se tiñe por este procedimiento en unas condiciones en las que la γ -globulina sí lo hace, por lo que se puede concluir que la P8 no contiene cantidades apreciables de hidratos de carbono, es decir, no parece ser una glicoproteína.

7) Electroforesis en gel de poliacrilamida de la P8 en presencia de SDS con o sin mercaptoetanol.

Para estudiar la posible presencia de puentes disulfuro entre las subunidades de la P8, la proteína se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida

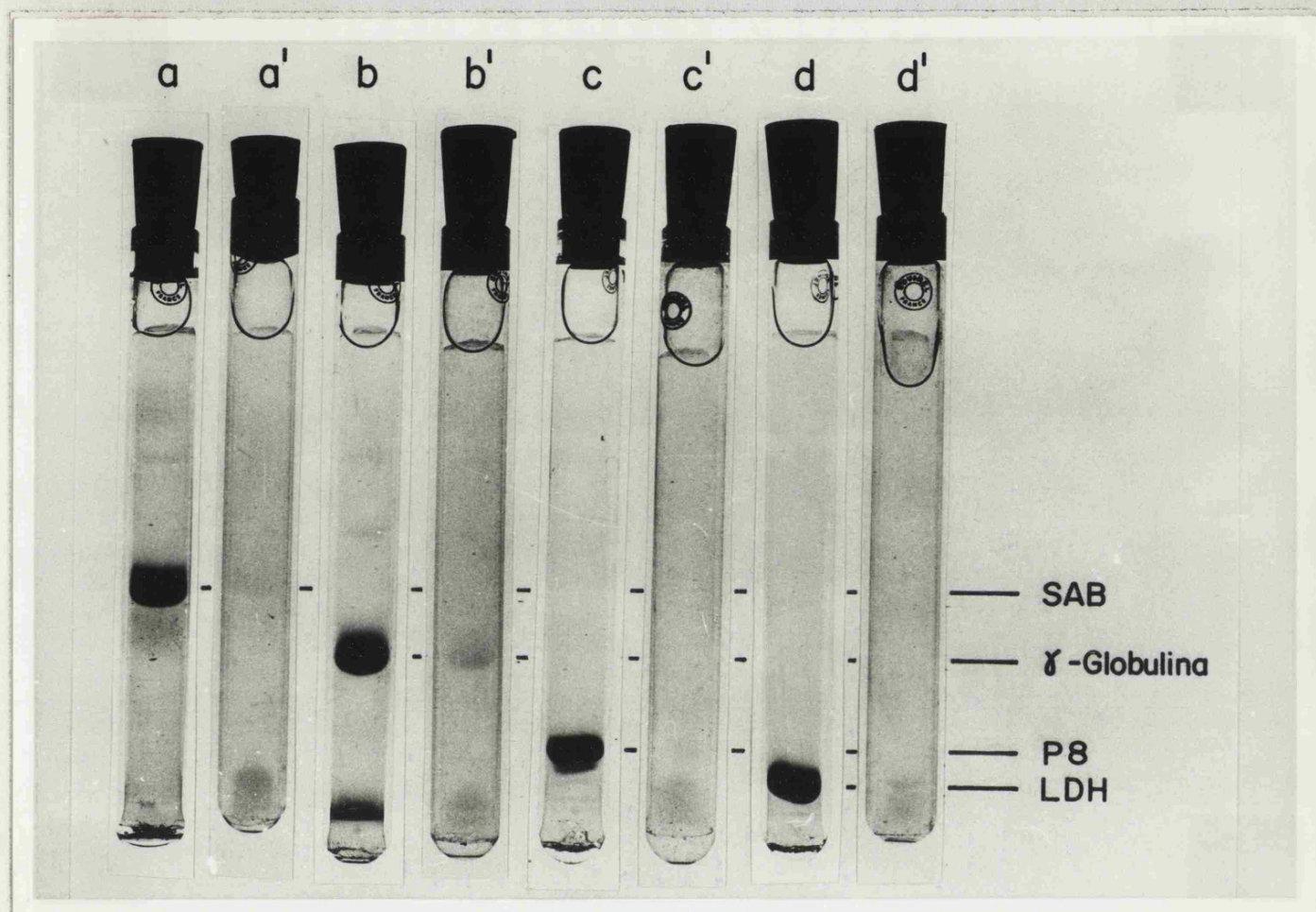


Figura 18. Tinción para glicoproteínas de la P8 de NIL-HSV. Alícuotas de 40 μ g de seroalbúmina de bovino, γ -globulina humana, P8 purificada de NIL-HSV y lactico deshidrogenasa se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, y a continuación se tiñeron con azul de Coomassie en la forma habitual (a,b,c y d, respectivamente), o bien con el reactivo de Schiff por el sistema de tinción de glicoproteínas (a',b',c' y d', respectivamente), como se describe en Métodos.

tanto en la forma habitual (hervida durante 2 minutos en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol al 1%) como sin mercaptoetanol. En la figura 19 se muestra el resultado de este experimento. Como puede verse la P8 no tratada con mercaptoetanol se desdobla en dos bandas, una de ellas de mayor movilidad que la P8 reducida con mercaptoetanol.

Las flechas en la figura 19 indican la posición de la γ -globulina y la seroalbúmina, que se llevaron como controles. Como se puede ver la γ -globulina no reducida corre mucho más lentamente en el gel, debido a la existencia de puentes disulfuro entre las subunidades de la proteína, mientras que la seroalbúmina se mueve más rápidamente que la reducida con mercaptoetanol, probablemente debido a un cambio de conformación de la molécula al no destruirse los puentes disulfuro presentes en el polipéptido (177).

De estos resultados se puede deducir que la P8 no presenta puentes disulfuro inter-cadenas, es decir, entre las subunidades que la componen, aunque por otro lado si parece tener puentes disulfuro intracadena.

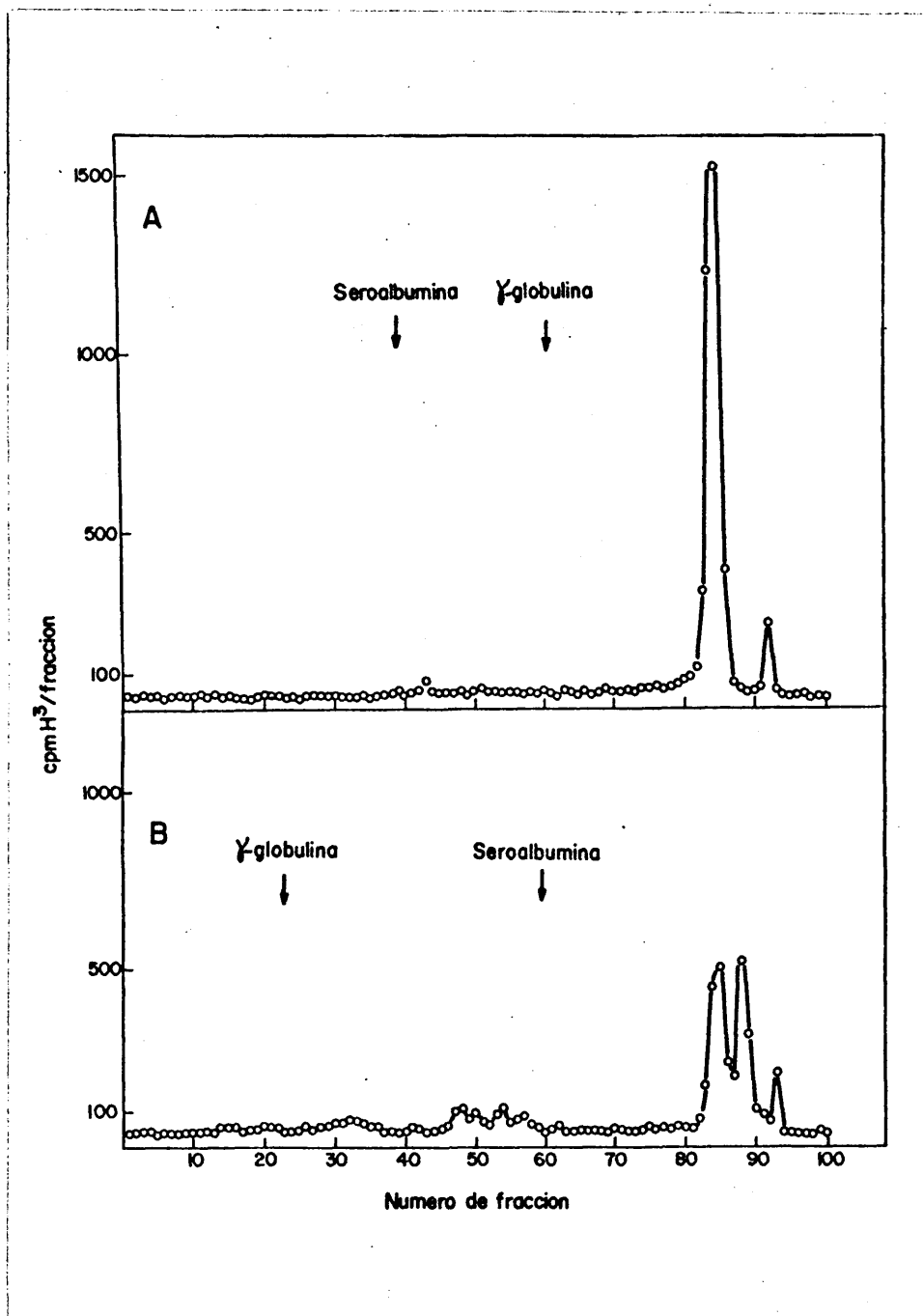


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la P8 purificada de NIL-HSV tratada o sin tratar con 2-mercaptoetanol. Alícuotas de 4,2 µg de P8 purificada radiactiva (1.300 cpm/µg) o de 20 µg de seroalbúmina y γ-globulina se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la forma habitual (A) o sin reducir la muestra con 2-mercaptoetanol (B). Los geles con la P8 radiacti

Figura 19. Continuación.

va se fraccionaron y se determinó la radiactividad como se describe en Métodos. Los geles llevados en paralelo con los marcadores se tiñeron de la forma habitual, determinándose la movilidad relativa de las proteínas con respecto al frente de azul de bromofenol.

C) INTERACCION DE LA PROTEINA 8 CON EL DNA

1) Unión a columnas de DNA-celulosa de la P8 purificada.

La proteína 8 radiactiva purificada conserva su capacidad de unión específica a DNA-celulosa, como se aprecia en la figura 20, donde se representan dos cromatografías de la P8 radiactiva llevadas en paralelo en microcolumnas de celulosa y DNA (desnaturalizado)-celulosa. En el primer caso toda la radiactividad introducida pasa a través de la columna sin fijarse; en el segundo la mayor parte de la radiactividad queda retenida en la columna, eluyéndose con ClNa 0,15 M, lo que indica que el proceso de purificación no modifica la afinidad de la proteína por DNA-celulosa.

2) Unión a DNA desnaturalizado homólogo.

Por experimentos de filtración a través de discos de nitrato de celulosa que retienen un complejo proteína-DNA, pero no el DNA libre, se ha po-

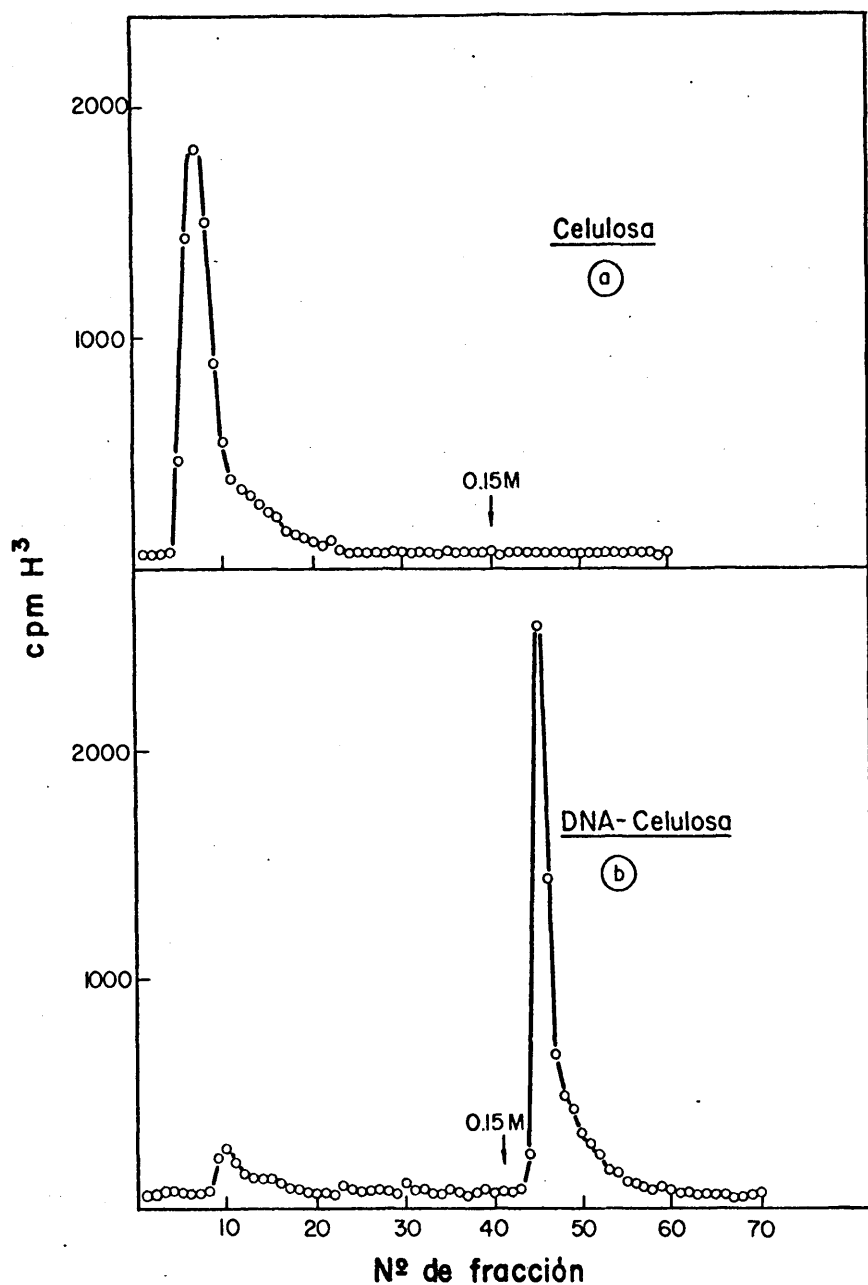


Figura 20. Cromatografía en columnas de celulosa y DNA (desnaturalizado)-celulosa de la P8 purificada radiactiva.

8 µg de P8-H³ purificada (1.300 cpm/µg) se cromatografiaron en paralelo en columnas (0,2 ml de volumen) de celulosa (a) y DNA(desnaturalizado)-celulosa (b), a 40°C y con un flujo de 3 ml/hora, recogiendo fracciones de 0,2 ml.

dido demostrar que la P8 se une a DNA homólogo desnaturalizado, mientras que no interacciona con DNA nativo. La figura 21 muestra el resultado de un experimento en el que se incubaron cantidades crecientes de P8 con DNA radiactivo de NIL-HSV, tanto nativo como desnaturalizado por el calor. Se puede observar que la P8 interacciona con el DNA desnaturalizado siendo la curva de retención al filtro fuertemente sigmoide. En contraste, el DNA nativo no queda retenido. También se representan en esta figura las curvas de retención del DNA desnaturalizado lavando o sin lavar el filtro con tampón de incubación (Véase el apartado correspondiente de Métodos). Como se puede ver, ambas curvas coinciden esencialmente, lo cual descarta la posibilidad de que la forma sigmoide de la gráfica de retención del DNA desnaturalizado fuese debida a un artefacto producido al desprenderse el complejo por el lavado del filtro. Como control del experimento se incubó en paralelo la RNA-Polimerasa altamente purificada de Bacillus subtilis con DNA tanto nativo como desnaturalizado, observándose retención al filtro de ambos tipos de DNA.

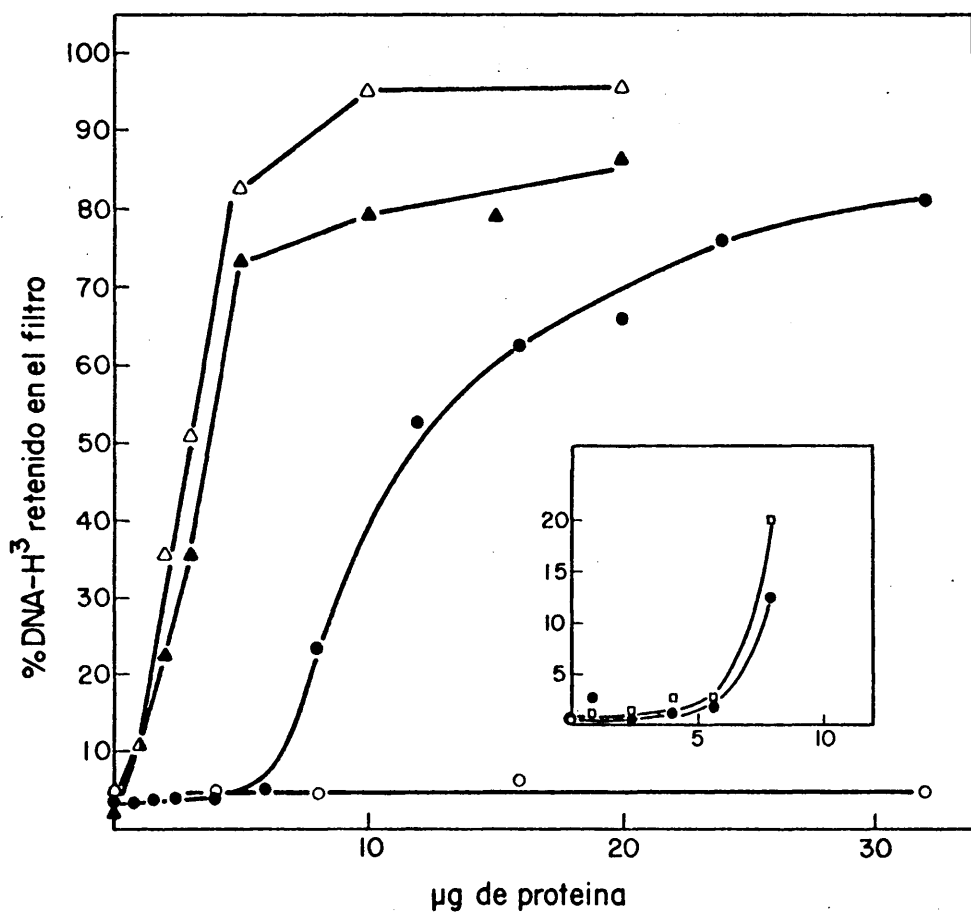


Figura 21. Interacción in vitro de la P8 purificada de NIL-HSV con el DNA homólogo.

Se incubaron las cantidades de proteína indicadas con 1,8 µg de DNA-H³ de NIL-HSV (1.600 cpm/µg), en las condiciones que se describen en Métodos.

△—△ : RNA-Polimerasa de B. subtilis + DNA-H³ de NIL-HSV nativo.

▲—▲ : RNA-Polimerasa de B. subtilis + DNA-H³ de NIL-HSV desnaturalizado.

○—○ : P8 + DNA-H³ de NIL-HSV nativo

●—● : P8 + DNA-H³ de NIL-HSV desnaturalizado.

Figura 21. Continuación,

En la gráfica pequeña se representa la zona inicial de la curva de retención en el filtro del DNA desnaturizado incubado con P8, lavando el filtro con tampón de incubación (●—●) y sin lavar (□—□).

3) Unión a DNA desnaturalizado heterólogo

En la figura 22 se muestra un experimento similar al descrito en el apartado anterior, pero utilizando un DNA heterólogo (DNA del bacteriófago Ø29 marcado con P^{32}). Como en el caso del DNA homólogo, la P8 interacciona con el DNA desnaturalizado de Ø29, dando lugar también a una curva sigmoide pero no se une al DNA nativo. También se muestran en esta figura los controles del experimento : incubación del DNA con RNA-Polimerasa de Bacillus subtilis, que produce retención del DNA tanto nativo como desnaturalizado, e incubación con seroalbúmina de bovino, que no interacciona con ninguno de los dos tipos de DNA.

De estos experimentos se deduce que la interacción de la P8 con el DNA desnaturalizado no es específica de secuencia.

4) Efecto de la temperatura y la fuerza iónica en la interacción P8-DNA

La interacción de la P8 con el DNA desnaturali

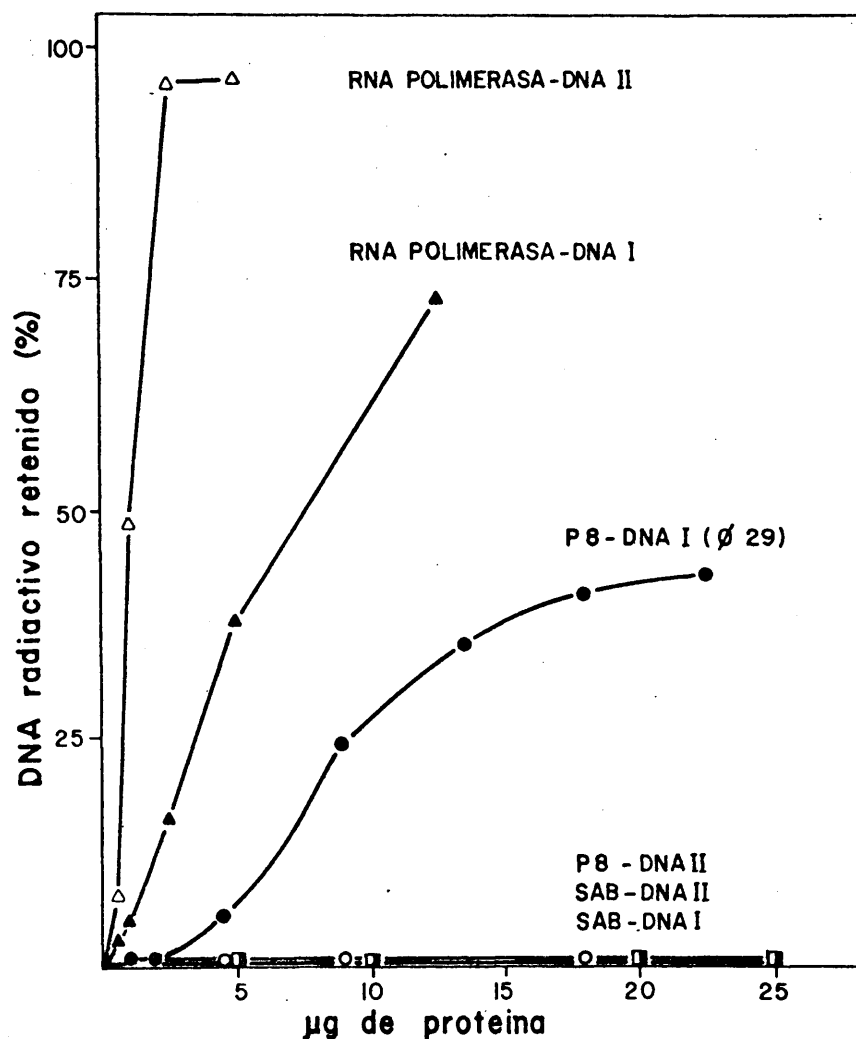


Figura 22. Interacción in vitro de la P8 purificada de NIL-HSV con DNA-P³² de ø29.

Se incubaron las cantidades de proteína indicadas con 0,9 µg de DNA-P³² de ø29 (5.400 cpm) nativo (DNA II) o desnaturalizado (DNA I), en las condiciones descritas en Métodos.

La RNA-Polimerasa utilizada fue de B. subtilis.
SAB : seroalbúmina de bovino.

zado es fuertemente dependiente de la temperatura y de la fuerza iónica. En la figura 23 se muestra el resultado de un experimento de filtración a través de discos Millipore, en el que se incubó la P8 purificada con DNA de NIL-HSV a 0°C ó 30°C, y a distintas concentraciones de ClNa.

En las condiciones del experimento, la interacción P8-DNA desnaturalizado a 30°C, presenta dos óptimos, correspondientes a concentraciones de ClNa de 15-30 mM y 75 mM, mientras que a 0°C la interacción decrece bruscamente a partir de ClNa 15 mM.

También se observa que la P8 no interacciona con el DNA nativo a concentraciones de ClNa por encima de 30 mM, detectándose sin embargo una pequeña retención al filtro del DNA nativo (un 10%) por debajo de esa concentración de ClNa.

5) Cinética de formación del complejo P8-DNA desnaturalizado.

La formación del complejo P8-DNA desnaturalizado es un proceso rápido, observándose un máximo de retención del DNA al filtro en menos de dos minutos de incubación a 30°C (Figura 24). Teniendo en cuenta es-

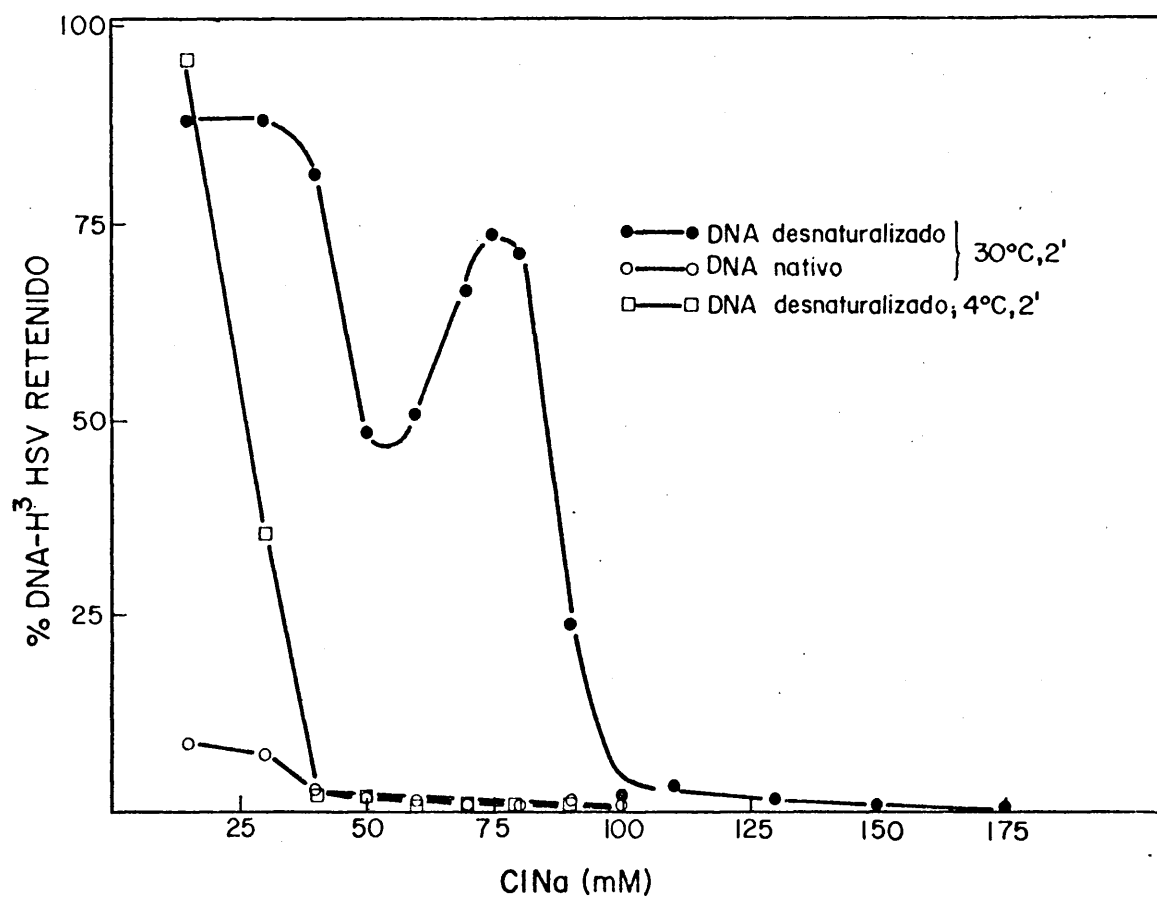


Figura 23. Efecto de la fuerza iónica y la temperatura sobre la interacción P8-DNA de NIL-HSV. Se incubaron, como se describe en Métodos, 12 μ g de P8 purificada con 1,6 μ g de DNA-H³ de NIL-HSV (1.600 cpm/ μ g) a las concentraciones de ClNa y temperatura indicadas.

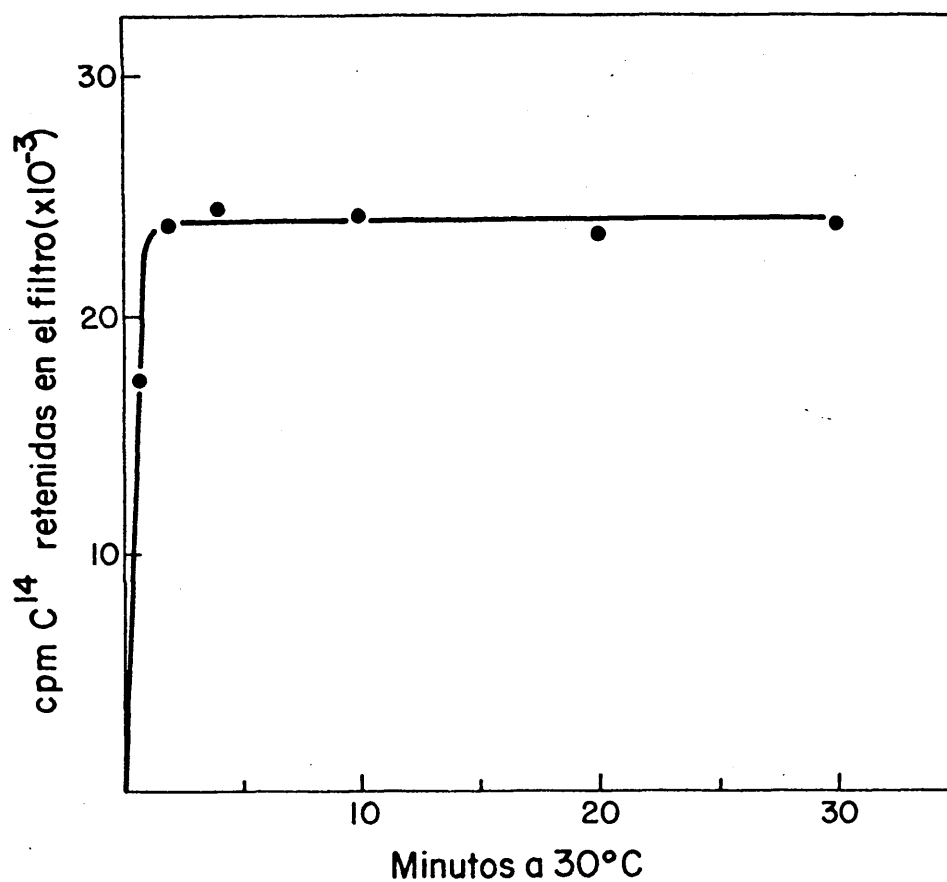


Figura 24. Cinética de formación del complejo P8-DNA desnaturalizado homólogo.

Se incubaron a 30°C 17 µg de P8 purificada de NIL-HSV con 2 µg de DNA-C¹⁴ desnaturalizado homólogo (18.000 cpm/µg) en un volumen de 75 µl de TL con ClNa 75 mM, durante los tiempos indicados.

te resultado, así como el obtenido en el experimento descrito en el apartado anterior, los experimentos subsiguientes se llevaron a cabo, a menos que se especifique lo contrario, incubando la P8 con el DNA durante 5 minutos a 30°C y a una concentración de ClNa 75 mM.

6) Efecto de cationes divalentes sobre la interacción P8-DNA.

El efecto del Mg^{++} sobre la interacción P8-DNA desnaturalizado se estudió también por la técnica de filtración en Millipore, encontrándose que este catión produce una inhibición de la formación del complejo P8-DNA, que llega a un 90% a una concentración de 10 mM, como se muestra en las figuras 25 y 26. Asimismo, se estudió el efecto del Mn^{++} sobre dicha interacción observándose también una inhibición de la formación del complejo, que en este caso no llega a ser completa (Figura 27).

7) Curva de concentración de DNA

En la figura 28 se muestra el resultado de un experimento en el que se incubaron 3 cantidades distintas de P8 purificada (5, 10 y 15 µg) con cantidades crecientes de DNA desnaturalizado de Ø29 marcado con

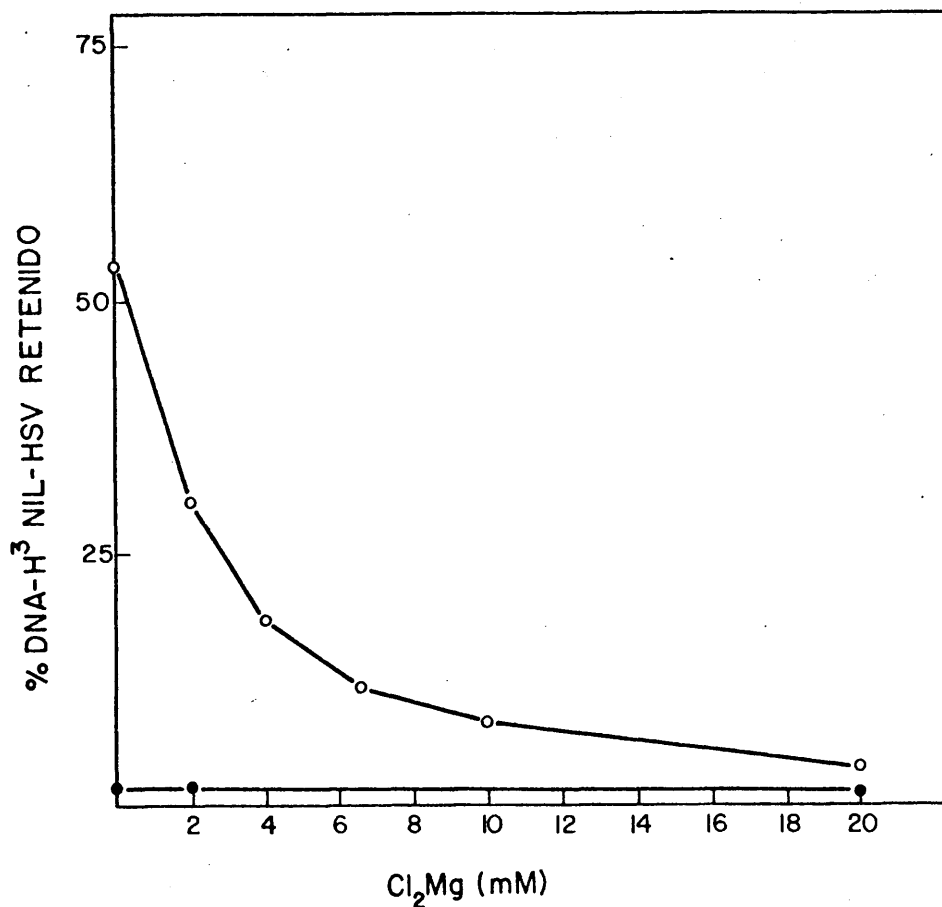


Figura 25. Efecto de la concentración de Mg^{++} sobre la interacción P8-DNA desnaturalizado homólogo.

Se incubaron como se describe en Métodos 15 μg de P8 purificada con 1,5 μg de DNA-H³ desnaturalizado de NIL-HSV (2.000 cpm/ μg), a las concentraciones de Cl_2Mg indicadas. Los puntos negros indican el DNA retenido en el filtro incubado sin P8.

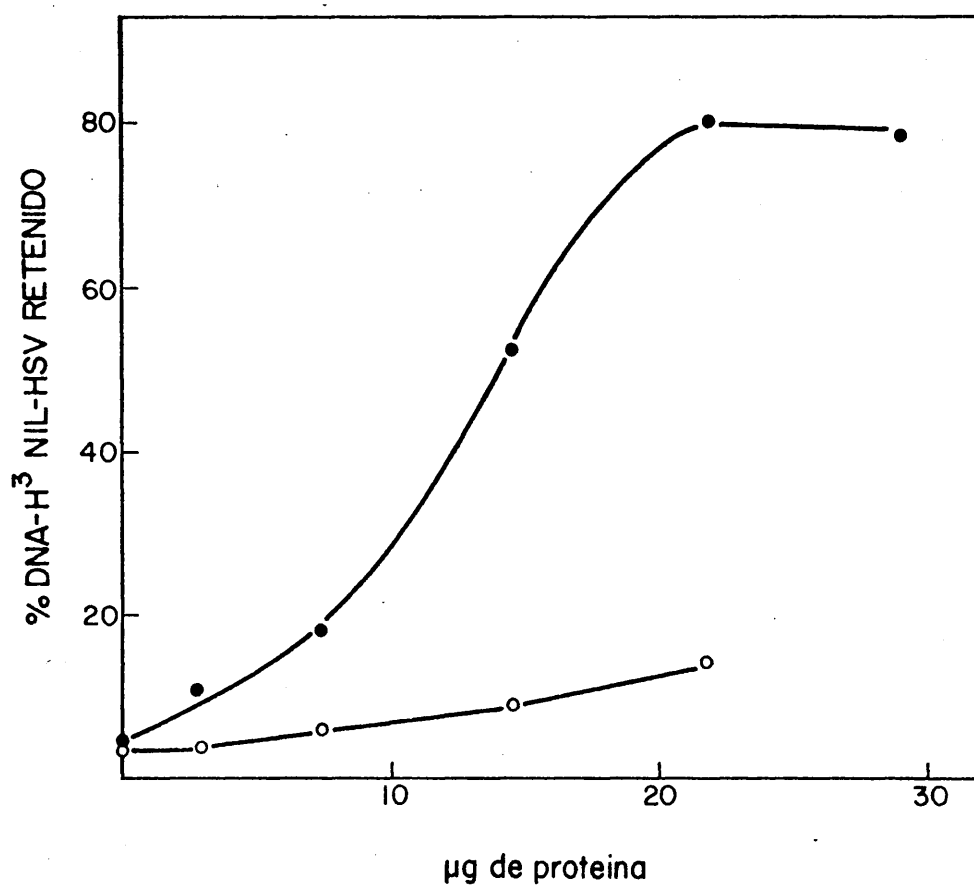


Figura 26. Efecto del Mg^{++} sobre la interacción P8-DNA a distintas concentraciones de proteína.

Se incubaron las cantidades de P8 indicadas con 1,3 µg de DNA-H³ desnaturalizado de NIL-HSV (1.600 cpm/µg) en ausencia (●—●) o en presencia de Cl_2Mg 10 mM (○—○), como se describe en Métodos.

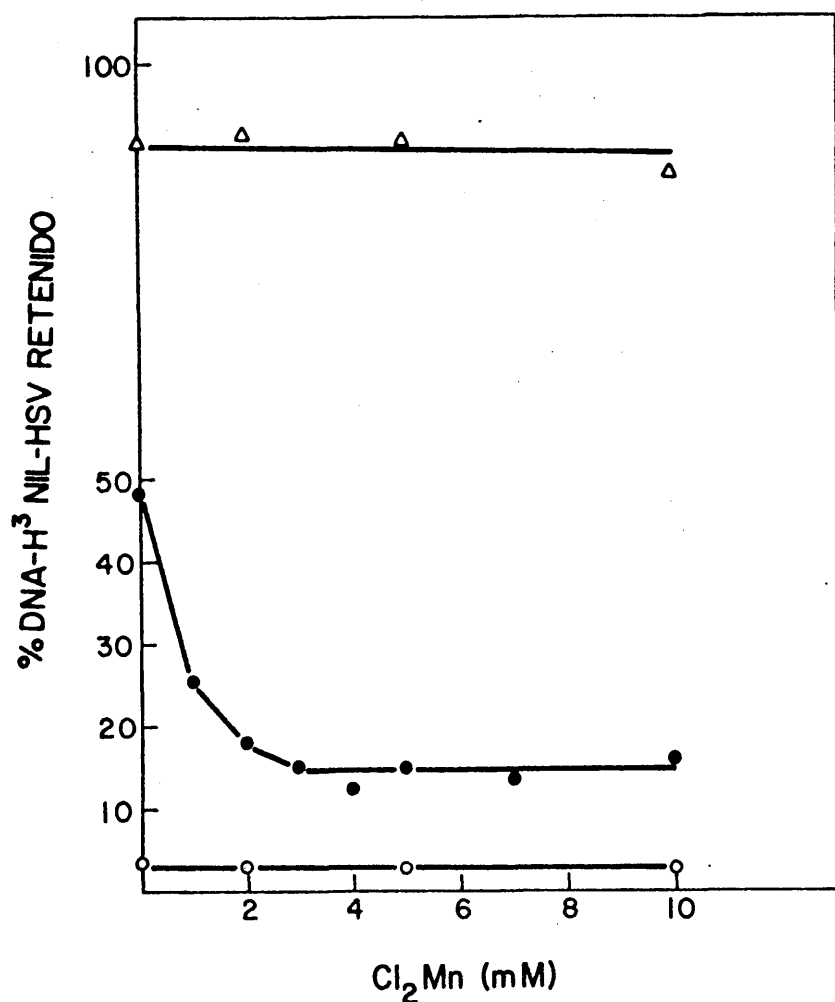


Figura 27. Efecto del Mn^{++} sobre la interacción P8-DNA desnaturalizado homólogo.

Se incubaron, como se describe en Métodos, 12 μg de P8 purificada (●—●) ó 8,75 μg de RNA-Polimerasa purificada de *B. subtilis* (▲ — ▲) con 1,8 μg de DNA- H^3 desnaturalizado de NIL-HSV (1.600 cpm/ μg), a las concentraciones de Cl_2Mn indicadas. Los puntos blancos indican el DNA retenido incubado sin proteína.

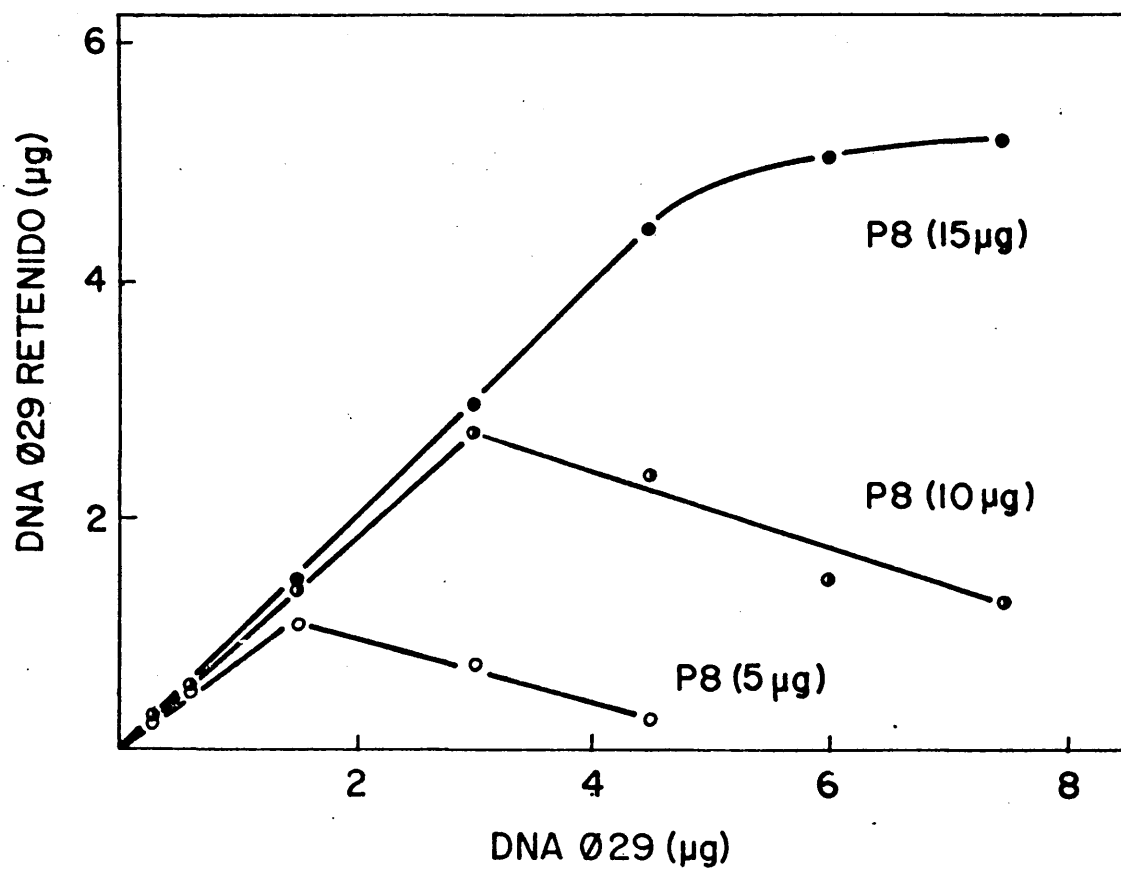


Figura 28. Interacción de la P8 con DNA de ø29. Efecto de la concentración de DNA.

Se diluyeron 0,5 µg de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de ø29 (1.560 cpm/µg) con cantidades crecientes de DNA desnaturalizado frío de ø29, y se incubaron en las condiciones descritas en Métodos, con 5, 10 ó 15 µg de P8 purificada.

C^{14} . Como se puede ver, la retención del DNA al filtro es lineal hasta que se alcanza un punto crítico, a partir del cual se produce una inhibición (con 5 y 10 μg de P8) o se estabiliza (con 15 μg de P8). Si se representa gráficamente el porcentaje de DNA retenido en el filtro frente a la relación DNA-P8 (Figura 29), se observa que el punto de inflexión se produce en los tres casos, a una relación DNA-P8 de 0,3, lo cual indica que la relación entre los dos componentes es muy crítica para la formación del complejo. Si se hace un cálculo del nº de moléculas de P8 fijadas a cada molécula de DNA, suponiendo que toda la proteína es activa, y sabiendo que una molécula de DNA desnaturizado de $\phi 29$ tiene 6×10^6 daltones de peso molecular (12 millones por molécula de DNA nativo) (178), se tiene que cada molécula de DNA puede fijar unas 165 moléculas de P8 tomando un peso molecular de 120.000 daltones para la P8 en estado nativo.

$$\frac{\frac{1 \mu\text{g DNA desnaturizado}}{6 \times 10^6 \text{ (Peso molecular DNA)}}}{\frac{3,3 \mu\text{g P8}}{120 \times 10^3 \text{ (Peso molecular P8)}}} = \frac{0,16 \times 10^{-6} \mu\text{moles DNA}}{2,75 \times 10^{-6} \mu\text{moles P8}} = \frac{1 \text{ mol DNA}}{165 \text{ moles P8}}$$

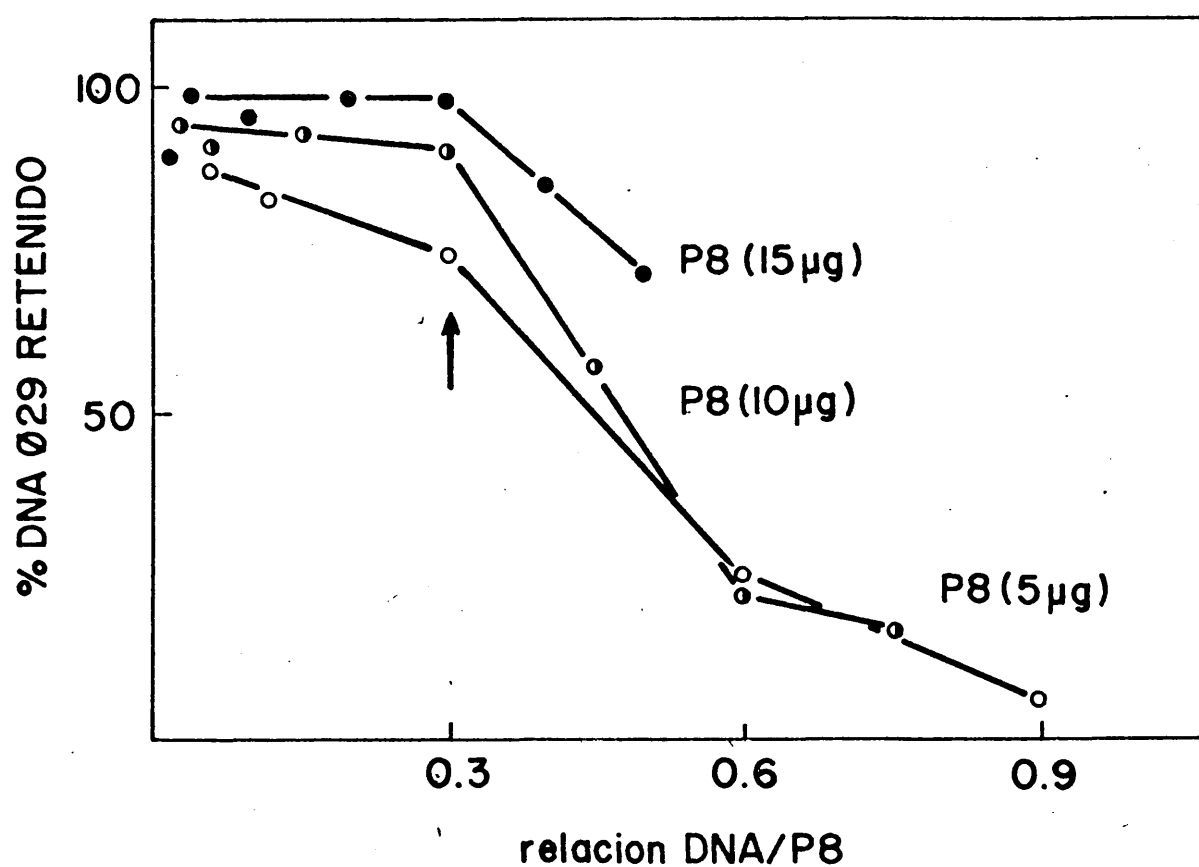


Figura 29. Unión de la P8 al DNA de Ø29 en función de la relación DNA/P8.

Se representan los puntos de la gráfica anterior frente a la relación DNA/P8.

O bien, una molécula de P8 fijada por cada 110 nucleótidos :

$$1 \text{ mg de DNA desnaturalizado } \phi 29 = \frac{6,6 \times 10^6}{330} = 1,81 \times 10^4 \text{ moles nucleótidos}$$

$$\frac{1,81 \times 10^4 \text{ moles nucleótidos}}{165 \text{ moles de P8}} = \frac{109,6 \text{ nucleótidos}}{1 \text{ molécula P8}}$$

8) Efecto del tamaño del DNA en la interacción con la P8.

La interacción de la P8 con el DNA desnaturalizado es fuertemente dependiente del tamaño de éste : cuanto mayor es el tamaño del DNA, más fácilmente es retenido en el filtro. Este hecho se muestra en la tabla X, donde se representan las cpm retenidas en el filtro, correspondientes a DNA desnaturalizado de NIL-
HSV, bien sin procesar o sonificado. El tamaño aproximado del DNA sonificado es de unos 200.000 ± 100.000 daltones, mientras que el DNA sin sonificar presenta un tamaño heterogéneo que varía entre unos 10×10^6 a $0,6 \times 10^6$ daltones, con una mayor abundancia de moléculas de 1 a 5 millones, como se observa en la figura 30, donde se representa una electroforesis en gel de agarosa de los dos tipos de DNA, junto con los fragmentos de digestión del DNA de $\phi 29$ por la endonucleasa de

Tabla X. Efecto del tamaño del DNA sobre la interacción con la proteína 8.

	cpm C ¹⁴ totales	cpm-C ¹⁴ retenidas en el filtro	% retención
DNA-C ¹⁴ desnaturalizado	20.675 (1,14 µg)	14.726 14.567	71 70
DNA-C ¹⁴ desnaturalizado y sonicado	23.308 (1,29 µg)	657 718	2,8 3,0

Se incubaron a 30°C durante 5 minutos 10 µg de P8 con la cantidad indicada de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de NIL-HSV sin sonicar o sonicado durante 60 segundos, en un volumen de 0,1 ml de TL con ClNa 75 mM, procesándose a continuación en la forma habitual.

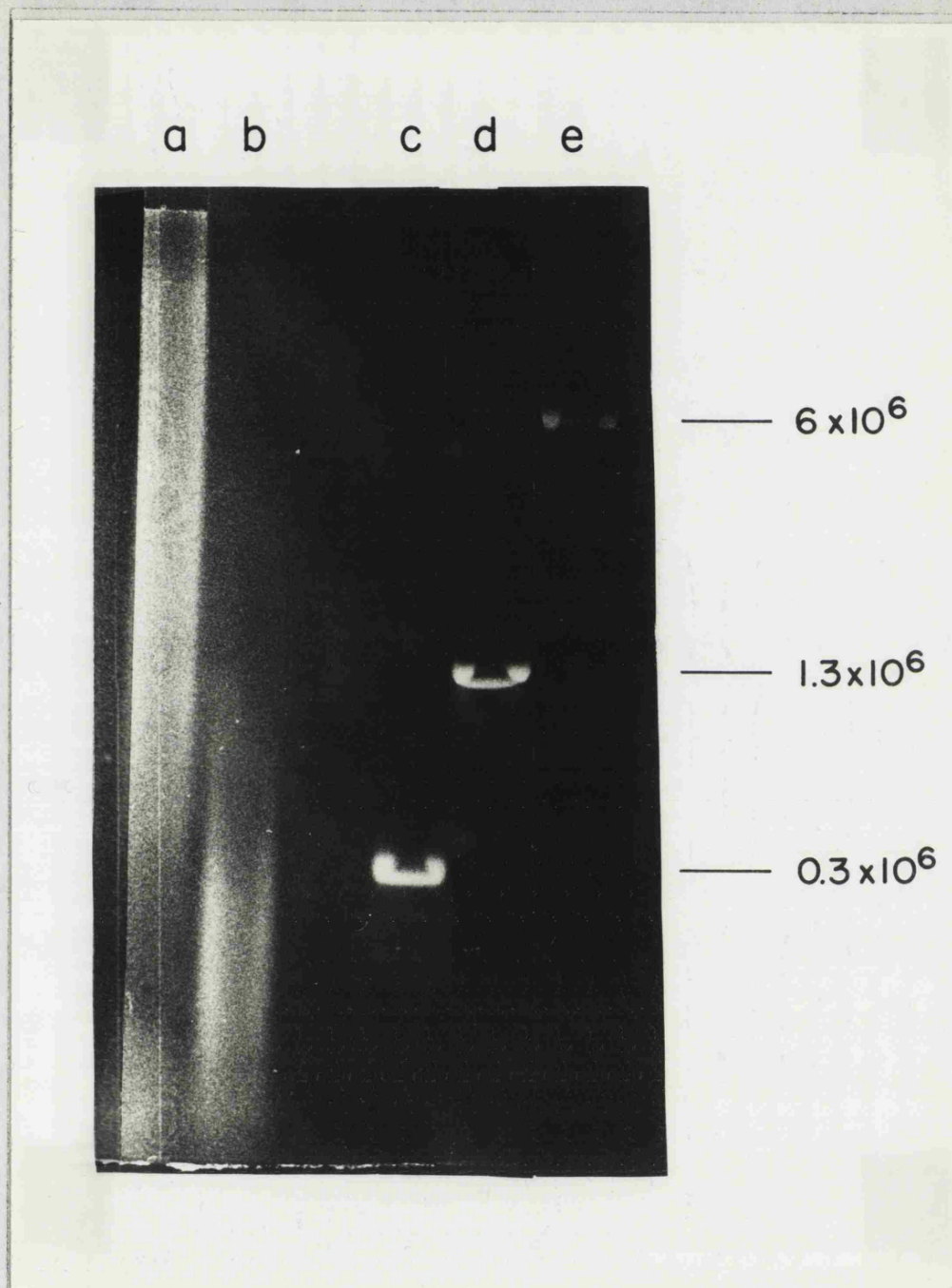


Figura 30. Tamaño del DNA de NIL-HSV utilizado en los experimentos de interacción con la P8 purificada. Se sometieron a electroforesis en placa de agarosa alícuotas de 10 μg del DNA- C^{14} de NIL-HSV utilizado en el experimento descrito en la Tabla X, bien sin sonicar (a) o sonicado (b) durante 1 minuto en pulsos de 10 segundos. Se llevaron en paralelo alícuotas de 1-5 μg de los fragmentos del DNA de $\phi 29$ producidos por trata-

Figura 30. Continuación.

miento con la endonucleasa de restricción EcoRI (c,d y e). A la derecha se representa el peso molecular de dichos fragmentos.

restricción EcoR1, que sirvieron como marcadores de peso molecular (178).

9) Precipitación del complejo P8-DNA desnaturalizado.

La retención en filtros de nitrocelulosa de complejos DNA-proteína parece deberse al hecho de que las proteínas, en general, quedan atrapadas en dichos filtros (180). Para ver si la P8 se comportaba de esta manera, se filtraron distintas cantidades de proteína marcada radiactivamente a través de discos Millipore. El resultado se muestra en la tabla XI. Se puede apreciar que la P8 apenas queda retenida en el filtro, en contraste con otras proteínas del extracto celular o del pico de ClNa 0,15 de la columna de DNA (nativo)-celulosa, que se fijan en un 50%. Por lo tanto, la retención del complejo P8-DNA desnaturalizado a los filtros Millipore no se debe al fenómeno antes descrito.

La causa de la retención del complejo P8-DNA desnaturalizado en los filtros de nitrocelulosa se esclareció al observarse que la interacción de la P8 con el DNA de una sola banda da lugar a la formación de un complejo insoluble que puede sedimentarse a baja velocidad. Esto se ve en la tabla XII, donde se muestra la

Tabla XI. Retención de la P8 radiactiva a los filtros Millipore.

Proteína radiactiva	cpm totales	cpm retenidas en el filtro	% retención
Extracto celular total	21.243	11.615	54,6
	24.589	12.107	49,2
Pico ClNa 0,15 M columna DNA (nativo)-celulosa	7.800	3.582	45,9
	19.500	9.017	46,2
P8 purificada	2.556	92	3,5
	5.113	187	3,6
	7.601	199	2,6
	10.092	204	2,0

Se filtraron a través de discos de nitrato de celulosa distintas cantidades de proteína tritiada (1.800 cpm/ μ g) en las condiciones en que se realizaron los experimentos de interacción de la P8 con el DNA. La radiactividad retenida en el filtro se determinó de la manera habitual.

Tabla XII. Precipitación de DNA - H³ desnaturalizado de NIL-HSV por la proteína 8 purificada de NIL-HSV.

	cpm DNA-H ³ NIL-HSV incubado con P8			cpm DNA-H ³ NIL-HSV incubado sin P8		
	30°C			0°C		
Conc. ClNa.	15mM	75mM	15mM	75mM	15mM	75mM
Sobrenadante	136	245	160	2003	1656	1762
	132	216	156	1920	1821	1835
Sedimento	2412	2294	2650	98	80	53
	2483	2496	2780	182	100	107
Filtro Millipore 2464	2123	2203	76	---	51	49
		2318	74			

Se incubaron en un volumen de 0.1 ml de TL a la temperatura y concentración de ClNa indicadas, 1.75 µg de DNA-H³ desnaturalizado de NIL-HSV (1600 cpm/µg) con 12 µg de P8 purificada. Las condiciones del experimento se describen en Métodos.

radiactividad debida al DNA-H³ de NIL-HSV presente en el sobrenadante y en el sedimento resultantes de centrifugar a 8.000 rpm durante 10 minutos el complejo P8-DNA, a varias temperaturas y fuerzas iónicas. Como se puede observar hay una perfecta correspondencia entre las cpm presentes en el sedimento y las retenidas en el filtro Millipore. Por lo tanto, lo que se había estado detectando por la técnica de filtración en discos de nitrocelulosa no era un complejo soluble de la P8 con el DNA desnaturalizado como el formado entre la RNA-Polimerasa y el DNA (180), sino la precipitación del DNA por la P8, actuando los filtros Millipore simplemente como tamices que impiden el paso del complejo insoluble.

Esta precipitación del DNA por la P8 parece ser irreversible, ya que la adición de Cl₂Mg 12,5 mM (que produce una inhibición de la interacción P8-DNA), o el descenso de la temperatura a 0°C no tienen ningún efecto sobre el complejo preformado, al menos en el tiempo estudiado (Figura 31).

10) Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA.

La estequiometría de la precipitación del complejo P8-DNA desnaturalizado, es decir, la cantidad

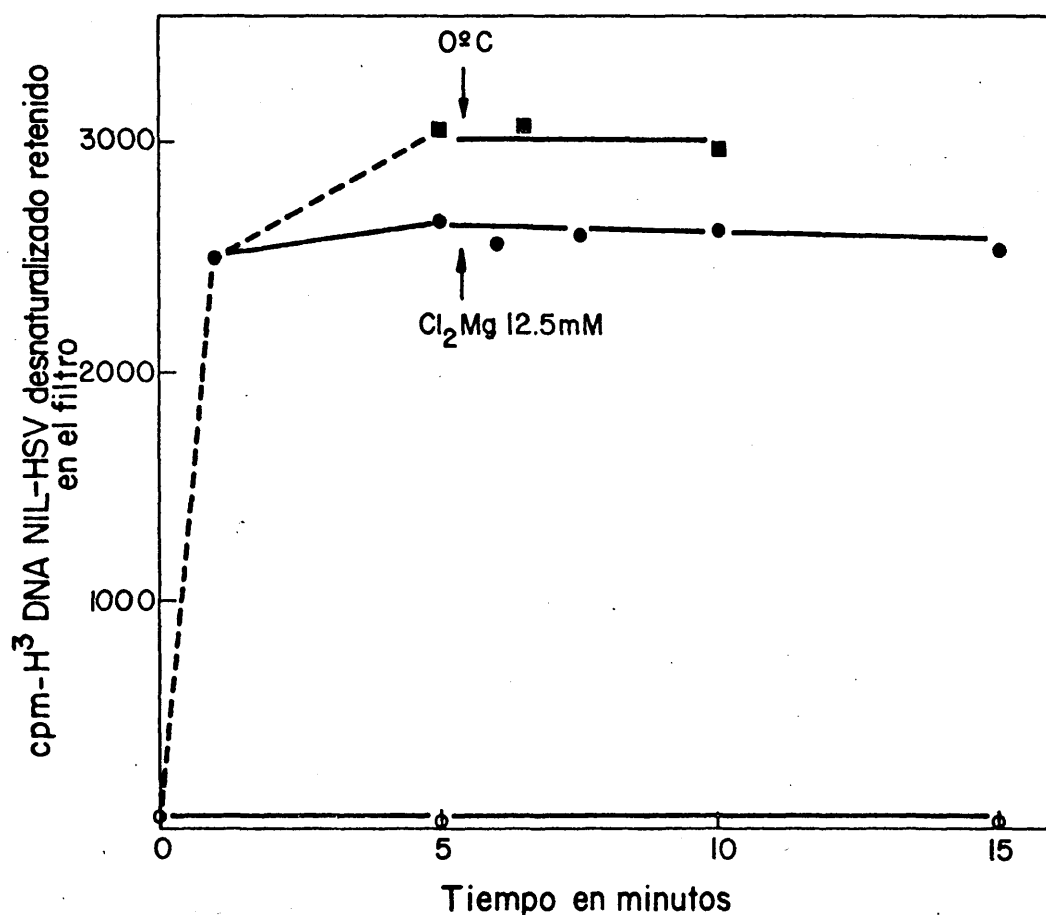


Figura 31. Irreversibilidad de la precipitación del complejo P8-DNA desnaturalizado homólogo.

●—● : Efecto de la adición de Mg^{++} al complejo P8-DNA- H^3 desnaturalizado de NIL-HSV. Se incubaron a $30^{\circ}C$ en TL con ClNa 65 mM en un volumen de 0,6 ml, 9,6 μg de DNA- H^3 desnaturalizado de NIL-HSV (1.600 cpm/ μg) con 72 μg de P8 purificada. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 100 μl que se filtraron por discos Millipore. Al tiempo señalado en la gráfica con una flecha, se añadió Cl_2Mg para una concentración final de 12,5 mM, y se siguieron tomando alícuotas de 100 μl que se filtraron de idéntica manera, determinándose la radiactividad como

Figura 31. Continuación.

se describe en Métodos.

■ — ■ : Efecto del enfriamiento sobre el complejo P8-DNA-H³ desnaturalizado de NIL-HSV. Se incubaron a 30°C en T1 con ClNa 65 mM en un volumen de 0,3 ml, 4,8 µg de DNA-H³ desnaturalizado de NIL-HSV (1.600 cpm/µg) con 36 µg de P8 purificada. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 100 µl que se filtraron por discos Millipore. Al tiempo señalado en la gráfica por una flecha se cambió el tubo a un baño de hielo, y se siguió la incubación a esa temperatura, tomando alícuotas de igual manera.

○ — ○ : DNA retenido en los filtros incubado sin P8.

de P8 que coprecipita con el DNA, se estudió incubando una cantidad fija de DNA desnaturalizado radiactivo con cantidades crecientes de P8, fría o marcada radiactivamente.

En la figura 32 se muestra el resultado de un experimento en el que se incubaron 4 μg de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de NIL-HSV con las cantidades indicadas de P8 marcada con tritio, como se describe en Métodos. A continuación se centrifugó y se determinó la radiactividad debida a la proteína y al DNA en el sedimento. Se puede observar la forma sigmoide de la curva de precipitación del DNA, como se había observado previamente con el sistema de los filtros de nitrocelulosa, confirmándose la perfecta correspondencia que existe entre el DNA retenido en el filtro y el DNA que es precipitado por la P8 (ver tabla XII). Al mismo tiempo se puede observar que la P8 que coprecipita con el DNA obedece también a una curva fuertemente sigmoide, cuyo máximo alcanza un valor de unos 13 μg . Si se tiene en cuenta esta parte de la curva, se puede calcular el valor máximo de moléculas de P8 que se unen a la cantidad de DNA utilizado y precipitan con

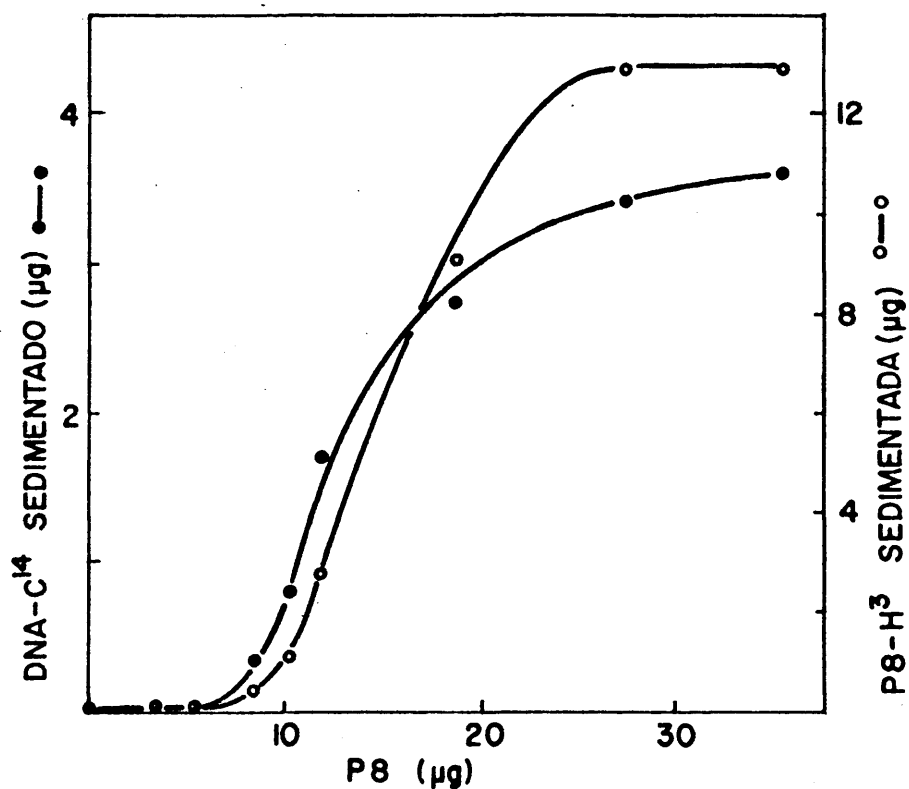


Figura 32. Precipitación del DNA desnaturalizado homólogo por la P8 purificada radiactiva de NIL-HSV . Estequiometría del complejo insoluble.

1,7 µg de P8-H³ purificada (1.880 cpm/µg) se diluyeron con cantidades crecientes de P8 fría purificada y se incubaron a 30°C durante 5 minutos con 3,8 µg de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de NIL-HSV (985 cpm/µg) en las condiciones indicadas en Métodos. A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 8.000 rpm en el rotor SS-34 de una centrífuga Sorvall, determinándose la radiactividad debida a la proteína y al DNA en los sedimentos, como se describe en Métodos.

el complejo. Este valor es de una molécula de P8 por cada 100 nucleótidos, tomando un peso molecular de 120.000 daltones para la P8 en estado nativo:

$$\begin{aligned}
 & \frac{13 \text{ } \mu\text{g de P8}}{120 \times 10^3 \text{ (Peso molecular de la P8)}} = 1,08 \times 10^{-4} \text{ les de P8} \\
 & \frac{3,6 \text{ } \mu\text{g de DNA}}{330 \text{ (Peso molecular de un nucleótido)}} = 1,09 \times 10^{-2} \text{ } \mu\text{moles de nucleótido} \\
 & = \frac{1 \text{ mol de P8}}{100,6 \text{ moles de nucleótido}}
 \end{aligned}$$

También se estudió la estequiometría de la precipitación del complejo P8-DNA utilizando proteína fría, calculando la cantidad de P8 que sedimenta con el DNA por electroforesis en placa de poliacrilamida, como se describe en Métodos. Para ello se incubaron 4 μg de DNA-C¹⁴ desnaturalizado de NIL-HSV con cantidades crecientes de P8 purificada en las condiciones descritas anteriormente. Al final de la incubación se centrifugaron las muestras, sometiendo los sedimentos y los sobrenadantes resultantes a electroforesis en placa de poliacrilamida (Figura 33).

Para calcular la proteína que precipita con el DNA y la que permanece soluble en el sobrenadante, se procesaron en paralelo cantidades conocidas de P8, con-

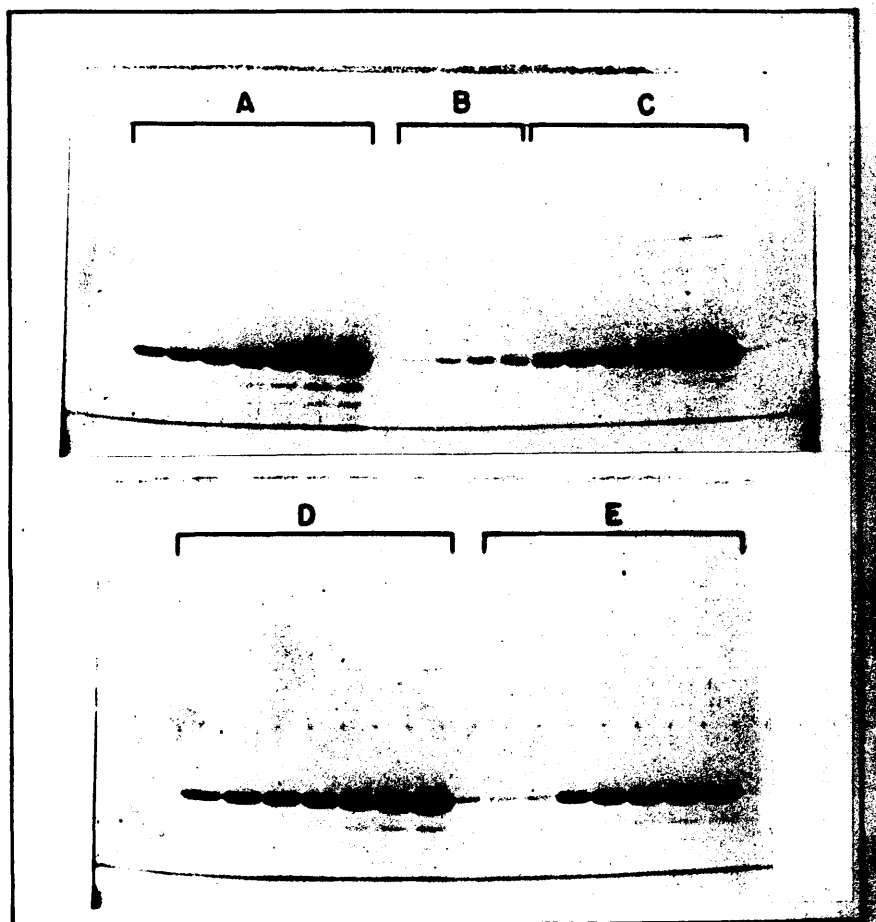


Figura 33. Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA. Electroforesis en placa de acrilamida de la P8 soluble y sedimentada con el DNA desnaturizado de NIL-HSV.

Se incubaron cantidades crecientes de P8 purificada con 4,2 μg de DNA- C^{14} desnaturizado de NIL-HSV (18.000 cpm/ μg), centrifugándose las muestras, como se describe en Métodos. La proteína presente en los sobrenadantes y los

Figura 33. Continuación.

sedimentos resultantes de la centrifugación se sometieron a electroforesis en placa de poliacrilamida en presencia de SDS como se describe en Métodos.

- A. De izquierda a derecha : cantidad de P8 presente en el sobrenadante después de incubar sin DNA 1,7, 3,4, 6,8, 10,2, 17, 25,5 y 34 μ g de proteína.
- B. De izquierda a derecha : Cantidad de P8 presente en el sedimento después de incubar sin DNA 1,7, 6,8, 17 y 34 μ g de proteína.
- C. De izquierda a derecha: Cantidad total de P8 sin incubar ni centrifugar correspondiente a 1,7, 3,4, 8,5 17, 25,5 y 34 μ g.
- D. De izquierda a derecha : Cantidad de P8 presente en el sobrenadante después de incubar con DNA 1,7, 3,4, 6,8, 10,2, 17, 25,5 y 34 μ g de proteína.
- E. De izquierda a derecha : Cantidad de P8 presente en el sedimento después de incubar con DNA 1,7, 3,4, 6,8, 10,2, 17, 25,5 y 34 μ g de proteína.

feccionándose curvas patrón como se describe en Métodos, bien por densitometría de las bandas de proteína, o bien por elución con piridina al 25% del colorante fijado a la proteína y determinación de su densidad óptica a 615 nm (Figura 34). Mediante estos dos métodos es posible determinar con precisión la cantidad de proteína correspondiente a una banda cualquiera. Para cantidades menores de 5 µg se utilizó la gráfica de densitometría; para cantidades mayores de 20 µg se empleó la gráfica de elución con piridina, y para las cantidades comprendidas entre 5 y 20 µg se utilizaron los dos sistemas, indistintamente.

En la figura 35 se muestra el resultado del experimento, pudiéndose observar, de igual manera que en la figura 32, la forma sigmoide de las curvas de precipitación de DNA y de proteína 8. Si se calcula la cantidad máxima de P8 fijada por nucleótido de DNA, de la misma forma que en el caso de la curva de precipitación del DNA con la P8 radiactiva, se obtiene un valor de 156 nucleótidos por molécula de proteína :

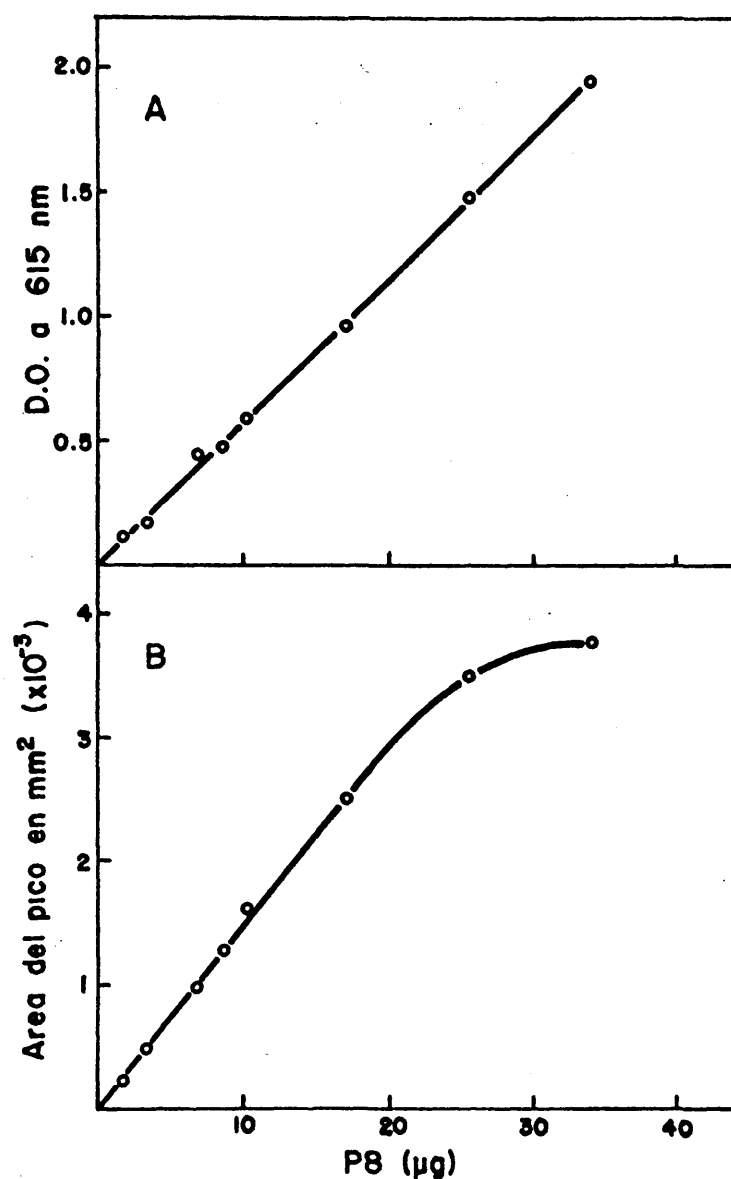


Figura 34. Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA.

Curvas de calibración para el cálculo de la P8 soluble y sedimentada con el DNA.

A: Curva de calibración por elución con piridina. Las bandas teñidas con azul de Coomassie correspondientes a cantidades conocidas de P8 (partes A y C de la figura 33) se recortaron de la placa, eluyéndose el colorante con piridina al 25%, como se describe en Métodos. La densidad

Figura 34. Continuación.

Óptica se determinó a 615 nm.

B: Curva de calibración por densitometría. Las bandas teñidas con azul de Coomassie correspondiente a cantidades conocidas de P8 (partes A y C de la figura 33) se densitometraron en un espectrofotómetro Gilford como se describe en Métodos, calculándose el área de cada pico obtenido.

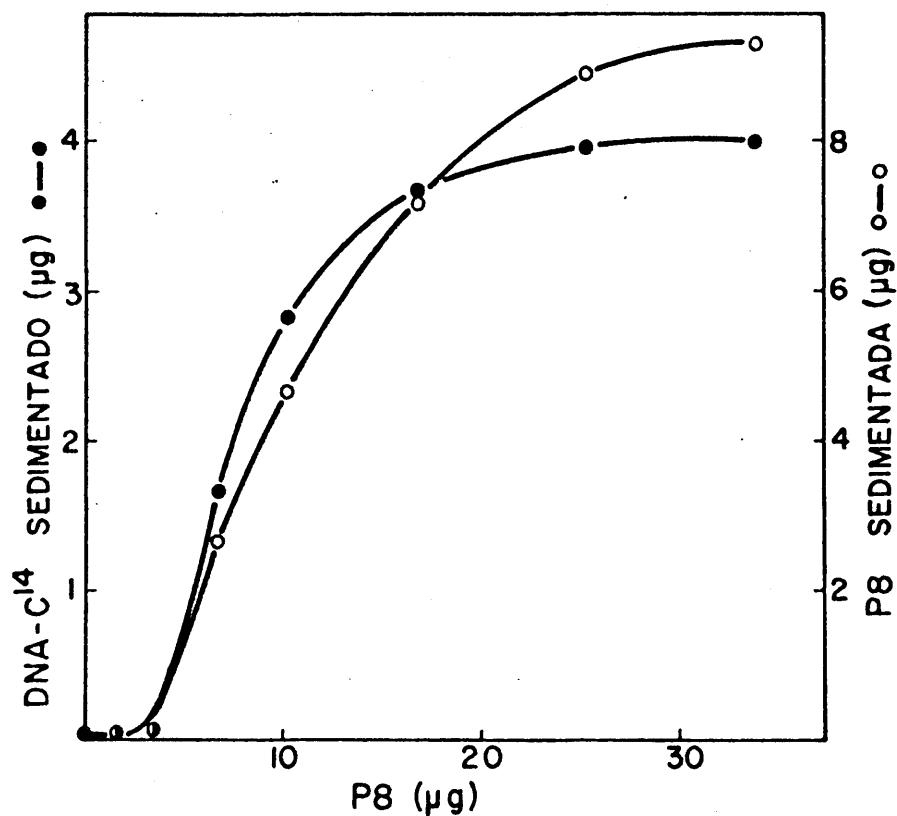


Figura 35. Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA. Precipitación del DNA desnaturalizado homólogo por la P8 purificada fría de NIL-HSV. Las cantidades de DNA y P8 presentes en los sedimentos del experimento descrito en la figura 33, calculadas como se describe en Métodos, se representan frente a las cantidades de P8 utilizadas.

$$\begin{aligned}
 & \frac{9.3 \mu\text{g de P8}}{120 \times 10^3 (\text{Peso molecular de la P8})} = \frac{7.75 \times 10^{-5} \mu\text{moles de P8}}{4 \mu\text{g de DNA}} \\
 & \frac{1}{330 (\text{Peso molecular de un nucleótido})} = \frac{1.21 \times 10^{-2} \mu\text{moles de nucleótidos}}{1 \text{ mol de P8}} \\
 & = 156 \text{ moles de nucleótidos}
 \end{aligned}$$

Si se representa el porcentaje de P8 sedimentada con el DNA frente a la relación P8 a DNA calculada a partir de las gráficas de precipitación del complejo P8-DNA desnaturalizado (Figuras 32 y 35), se obtiene el resultado que se muestra en la figura 36. En el panel A se representa la gráfica de precipitación del DNA con la P8 radiactiva, y en el B la correspondiente a la P8 fría. En ambos casos, el valor máximo de P8 que precipita con el DNA es de un 50% aproximadamente. Al mismo tiempo se observa que la relación P8/DNA a la cual se alcanza el máximo porcentaje de precipitación de proteína es diferente en los dos experimentos, siendo de 5 en el A y de 3 en el B. Por otra parte, la curva de precipitación del DNA también difiere en los dos casos, estando desplazada hacia la derecha en A con respecto a B, indicando que se nece-

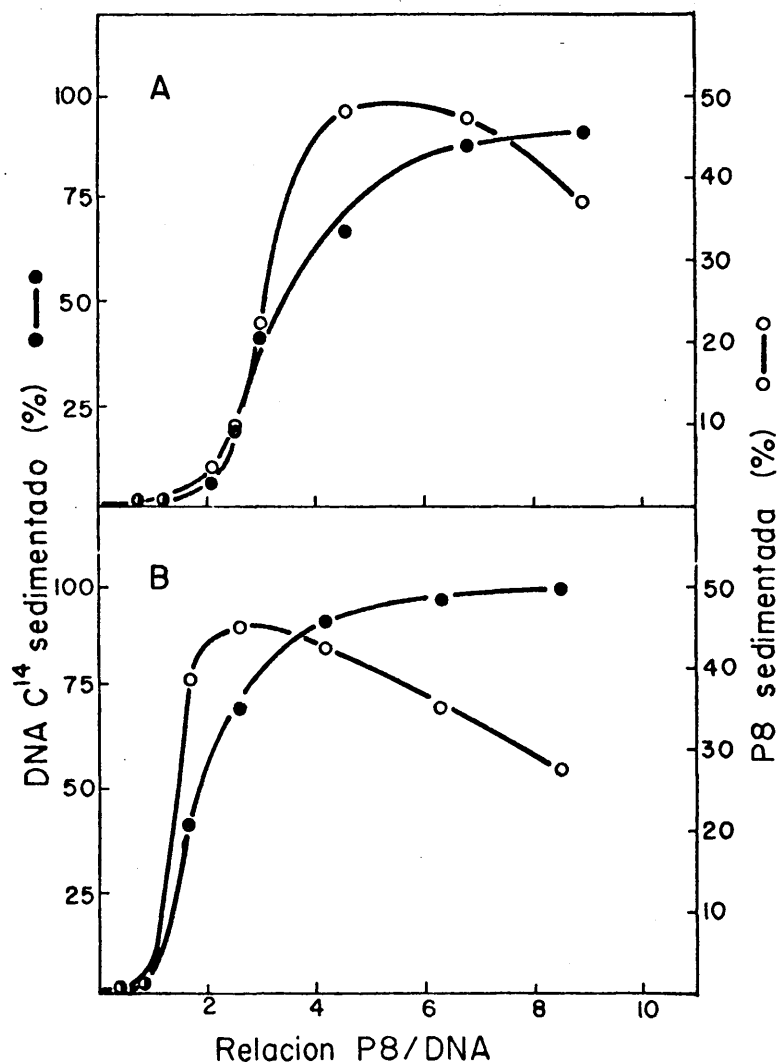


Figura 36. Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA. Porcentajes de P8 y DNA sedimentados en función de la relación P8/DNA.

Los porcentajes de DNA y P8 sedimentados en los experimentos de precipitación del complejo DNA desnaturalizado-P8 radiactiva (A) y DNA-desnaturalizado-P8 fría (B), descritos en las figuras 32 y 35, se representan frente a la relación P8-DNA.

sita mayor cantidad de proteína en A que en B para precipitar la misma cantidad de DNA.

A la vista de estos resultados, se sometieron a electroforesis en placa de agarosa alícuotas de los preparados de DNA utilizados en ambos experimentos, ya que el DNA-C¹⁴ utilizado en el experimento de precipitación con P8 radiactiva se había diluido con DNA frío que procedía de otra preparación. El resultado se muestra en la figura 37, donde se observa la diferencia de tamaño de las dos preparaciones de DNA, lo que puede dar cuenta de las diferencias observadas en los dos experimentos descritos (ver apartado C-8 de Resultados).

11) Interacción de la P8 con RNA, poli A y poli (dA-dT).

La P8 interacciona también con el RNA heterogéneo de NIL-HSV, y con los polímeros sintéticos poli A y poli(dA-dT), como se muestra en la figura 38, donde se representa el resultado de dos experimentos de filtración por discos Millipore en los que se incubaron cantidades crecientes de P8 purificada con 4,25 µg de poli A-C¹⁴ ó 4,30 µg de RNA-H³ de NIL-HSV (panel

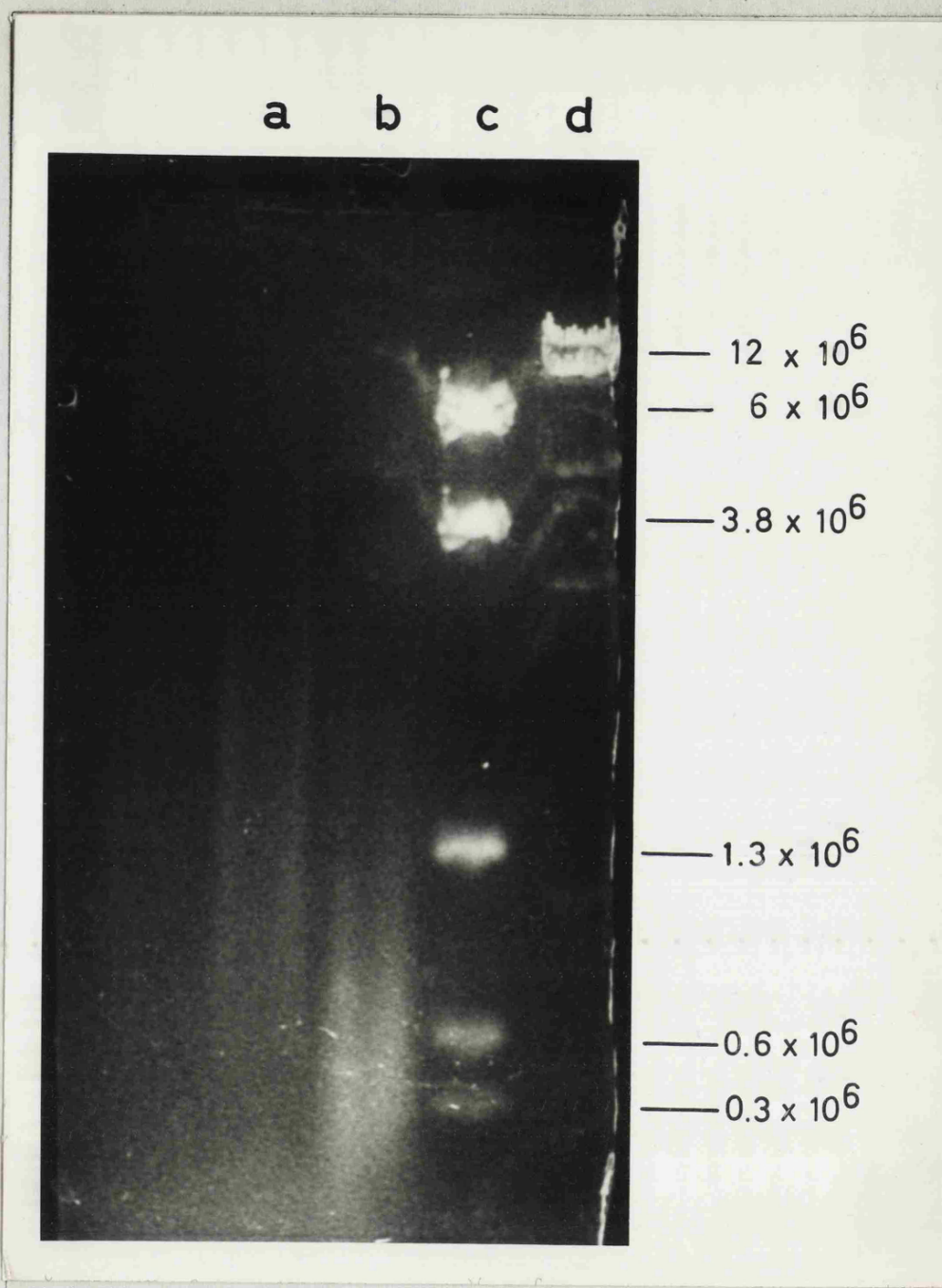


Figura 37. Estequiometría del complejo insoluble P8-DNA. Tamaño de los DNA utilizados en los experimentos de precipitación descritos en las figuras 32 y 35.

Alícuotas de 5 μg de los DNA- C^{14} desnaturalizados de NIL-HSV utilizados en los experimentos descritos en las figuras 32 (a) y 35 (b) se sometieron a electroforesis en placa de agarosa, como se describe en Métodos. Se llevaron en paralelo alícuotas de 10 μg del DNA de $\phi 29$ nati-

Figura 37. Continuación.

vo tratado con la endonucleasa de restricción EcoRI
(c) o de 5 µg del DNA de Ø29 nativo no tratado (d).
A la derecha se indican los pesos moleculares del DNA
de Ø29 y de los fragmentos mencionados anteriormente.

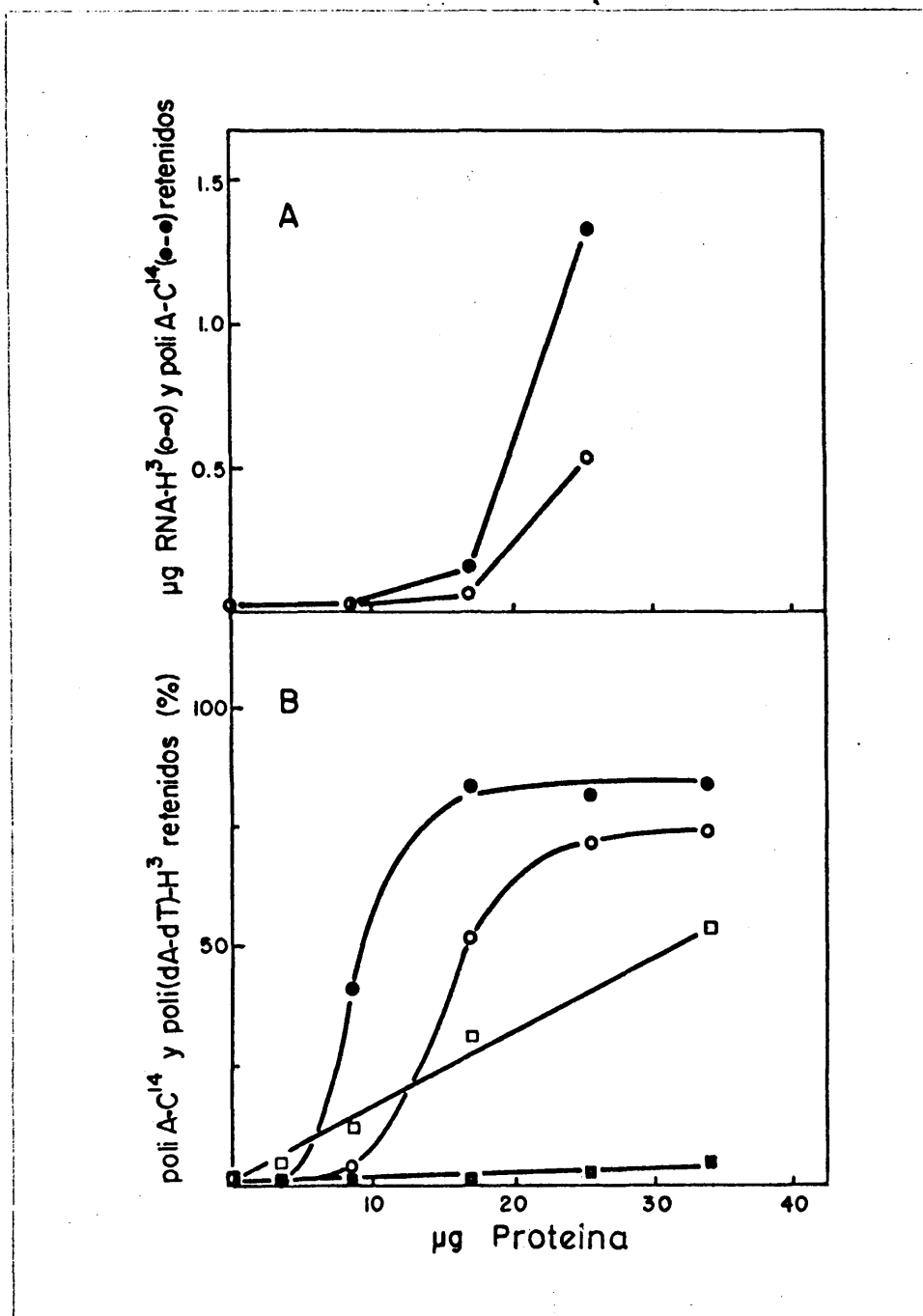


Figura 38. Interacción de la P8 con RNA homólogo, poli A y poli(dA-dT) desnaturalizado.

A. Se incubaron cantidades crecientes de P8 purificada con 4,3 μg de RNA-H³ heterogéneo de NIL-HSV (1.580 cpm/ μg) ó con 4,25 μg de poli A-C¹⁴ (1.230 cpm/ μg). Las muestras se filtraron por discos Millipore, como se describe en Métodos.

Figura 38. Continuación.

B. Se incubaron 1,3 μg de poli A-C¹⁴ (2.000 cpm/ μg) con cantidades crecientes de P8 purificada (●—●) ó de γ -globulina humana (■—■). Asimismo, se incubaron 1,2 μg de poli(dA-dT)-H³ desnaturalizado por calor (21.600 cpm/ μg) con cantidades crecientes de P8 purificada (o—o) ó de γ -globulina humana (□—□).

A), o bien con 1,30 μg de poli A-C¹⁴ ó 1,20 μg de poli (dA-dT)-H³ desnaturalizado por el calor (panel B), en un tampón de incubación que contenía ClNa 30 mM.

Nuevamente se puede observar la forma sigmoide de las curvas de retención de filtro de los ácidos nucleicos utilizados. Al mismo tiempo se observa un desplazamiento hacia la derecha de la curva de retención al filtro del poli A del panel A con respecto a la del panel B, debido probablemente a las cantidades distintas de polímero utilizadas, lo cual hace que la relación P8 a poli A sea mayor en el B que en el A. Por otro lado, la diferencia observada en las curvas de interacción de la P8 con el poli A y poli(dA-dT) (panel B) sugiere que la P8 tiene mayor afinidad por poli A que por poli (dA-dT) desnaturalizado.

En el panel B de esta figura se representa también la curva de retención en el filtro de poli A-C¹⁴ y poli (dA-dT)-H³ desnaturalizado incubados con γ -globulina humana, que se llevó como control del experimento, observándose que la γ -globulina no interacciona con el poli A, mientras que sí lo hace con el poli (dA-dT) desnaturalizado, como ha sido previamente descrito (181)

D) ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN PREPARADOS DE P8 PURIFICADA.

1) Actividad RNasa

Para ver si los preparados de P8 purificada tenfan niveles apreciables de actividad RNasa, se incubaron preparaciones de P8 con RNA-H³ heterogéneo de NIL-HSV en las condiciones de ensayo descritas en Métodos. Como se muestra en la tabla XIII, no se encontraron niveles apreciables de actividad RNasa en dos preparaciones distintas de P8. La radiactividad soluble procedente de la incubación de la P8 con RNA-H³ es la misma que la solubilizada por incubación en paralelo del RNA con el tampón sin protefna, y no aumenta con el tiempo de incubación. Por el contrario, aparece un aumento notable de radiactividad soluble por incubación del RNA-H³ con RNasa pancreática comercial. Estos resultados indican que los preparados de P8 no presentan contaminación apreciable por actividad RNasa.

2) Actividad DNasa.

Tampoco se ha detectado actividad DNasa de tipo exonucleasa en preparaciones de P8 purificada. Dicha

Tabla XIII. Ensayo actividad RNasa en Preparados de P8 purificada.

RNA-H³ NIL-HSV (9 µg, 1400 cpm/ µg) incubado con:

Tiempo incubación (minutos)	Tampón P8	P8 (18 µg)	P8 (10 µg)	RNasa pancreatica(1µg)
	cpm solubles			
0	80 (1,02)	51 (0,64)	54 (0,68)	57 (0,72)
10	54 (0,66)	85 (1,07)	54 (0,68)	4.547 (57,3)
20	64 (0,81)	74 (0,93)	124 (1,57)	5.068 (64,0)
30	71 (0,92)	51 (0,64)	85 (1,07)	4.976 (62,8)
60	68 (0,85)	73 (0,93)	85 (1,07)	4.879 (61,5)

Las condiciones de ensayo se describen en materiales y métodos. En la tabla se muestran los resultados obtenidos con dos preparados distintos de P8. Entre paréntesis se muestra el tanto por ciento de las cpm totales que se solubilizan en esas condiciones.

actividad se ensayó por incubación de la P8 con DNA- H^3 homólogo desnaturalizado (Tabla XIV), en las condiciones de ensayo descritas en Métodos. Por el contrario, la incubación con DNasa I pancreática dió lugar a la aparición de radiactividad soluble, aunque dichas condiciones de ensayo no son las óptimas para esta actividad, ya que la DNasa I es una endonucleasa que actúa mucho mejor con DNA nativo.

Por otra parte, también se ha valorado en las preparaciones de P8 purificada la actividad DNasa de tipo endonucleasa, por incubación de la P8 con el DNA de $\phi 29$ y posterior electroforesis en placa de agarosa, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 39. Se puede observar que la actividad DNasa presente en las preparaciones de P8 purificada es insignificante comparada con la actividad que se obtiene a la concentración más baja de DNasa I utilizada (1 nanogramo), por lo que se puede concluir que la P8 está esencialmente libre de contaminación por endonucleasa.

Por otra parte y para ver si la P8 es actina, se estudió su efecto sobre la actividad de la DNasa I pancreática, ya que se sabe que la actina inhibe fuertemente a la DNasa I pancreática, uniéndose a ella en

Tabla XIV. Ensayo actividad DNasa (exonucleasa) en preparados de P8 purificada.

DNA-H³ NIL-HSV (6 µg, 1630 cpm/ µg) incubado a 37°C con:

Tiempo incubación (minutos)	Tampón P8	P8 (20 µg)	DNasa I (0.5 µg)
	cpm solubles		
0	111 (1.92)	135 (2.35)	123 (2.14)
10	126 (2.18)	131 (2.28)	371 (6.45)
20	107 (1.86)	142 (2.48)	548 (9.55)
30	119 (2.07)	115 (2.00)	914 (15.9)
60	130 (2.24)	126 (2.19)	846 (15.0)

Las condiciones de ensayo se describen en materiales y métodos. Entre paréntesis se indica el tanto por ciento de las cpm totales que se solubilizan en esas condiciones.

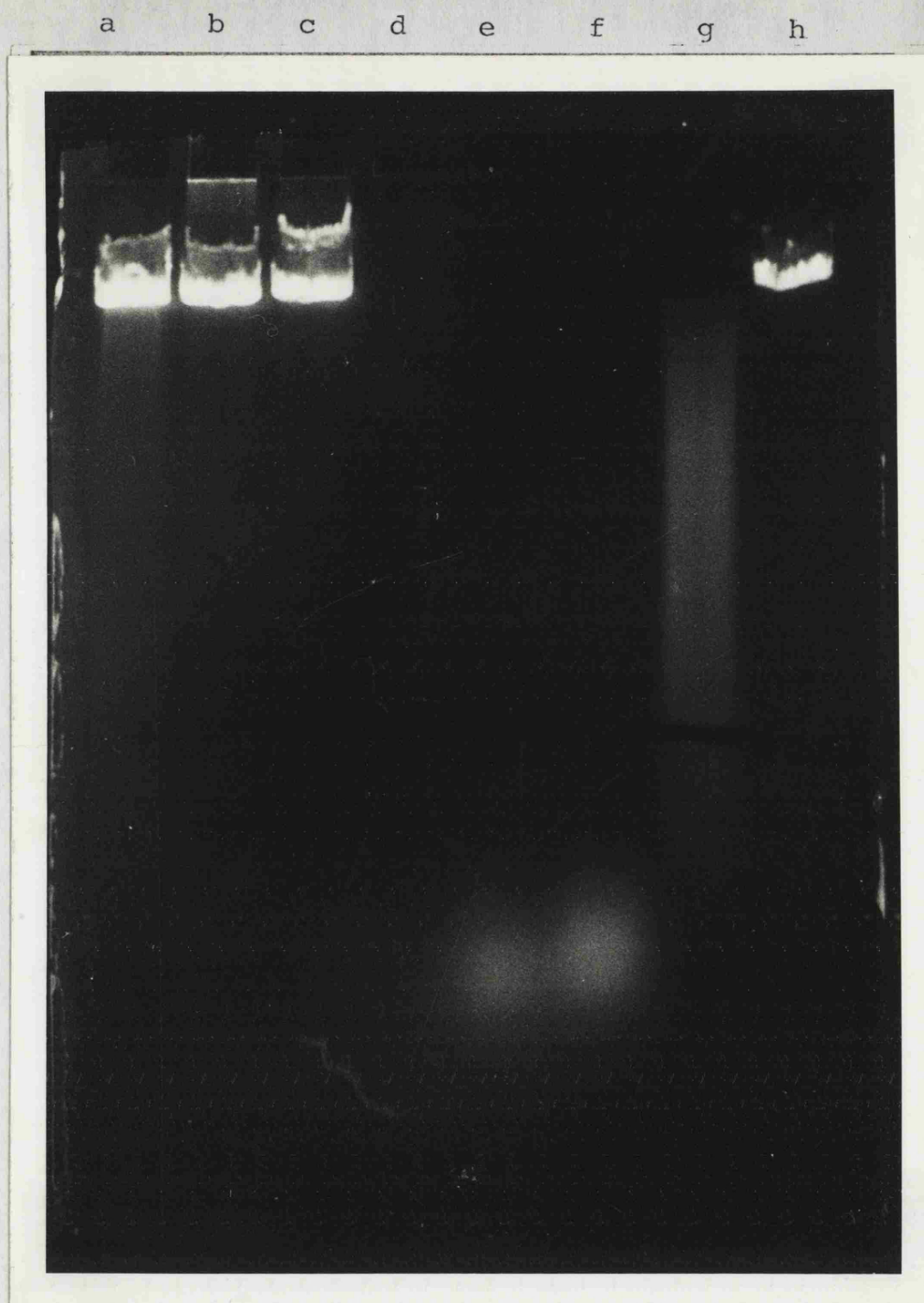


Figura 39. Valoración de DNasa (endonucleasa) en preparados de P8.

Electroforesis en placa de agarosa del DNA de $\phi 29$ (5,6 μg) incubado, en las condiciones descritas en Métodos, con : 26,5 (a), 10,6 (b) y 5,3 μg (c) de P8 purificada; 50 (d), 10 (e), 5 (f) y 1 nanogramos (g) de DNasa I pancreática; tampón de incubación (h).

cantidades equimolares e inactivándola (182). Para ello se utilizó el sistema de electroforesis en gel de agarosa del DNA de Ø29. Los resultados se muestran en las figuras 40 y 41. En la primera se observa que si se incubaba simultáneamente el DNA de Ø29 desnaturalizado con la P8 y la DNasa I pancreática no se observa ningún efecto sobre la actividad del enzima, lo cual indica que la P8 no es actina. Por otro lado, también se puede observar en esta figura que cuando la P8 se incubaba con el DNA sin DNasa, el DNA no penetra en el gel, lo cual se debe probablemente a que la P8 interacciona con el DNA formando un complejo que queda retenido en el origen del gel (179) (panel C).

Por el contrario, si se permite la formación del complejo insoluble P8-DNA desnaturalizado, y a continuación se añade DNasa, se produce una inhibición de la digestión del DNA por el enzima, como se aprecia en los paneles a y b de la figura 41. Sin embargo, en las condiciones utilizadas en el experimento, la unión de la P8 al DNA no protege totalmente a éste de la acción de la DNasa. Por otro lado, también se comprueba que la P8 no protege al DNA nativo del ataque enzimático (paneles c y f) aunque se puede observar que una

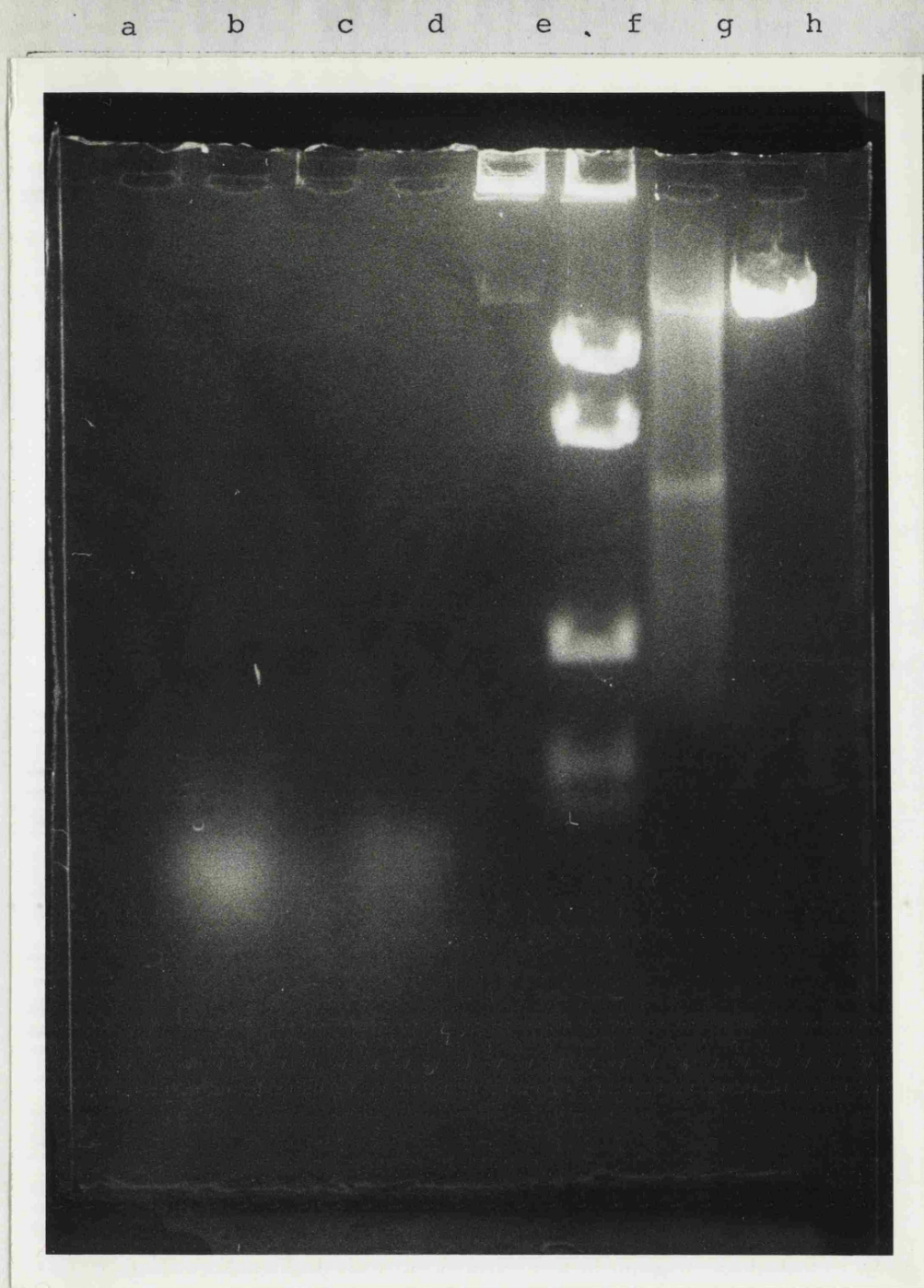


Figura 40. Efecto de la P8 sobre la actividad DNasa I. Se incubaron a 30°C en un volumen de 52 µl de una mezcla de reacción que contenía 10 µl de SSC 0,1X, 25 µl de TL con ClNa 0,15 M, 15 µl de Tl $\frac{1}{5}$ y 2 µl de Cl₂Mg 0,25 M, los siguientes componentes : 4,25 µg de DNA de Ø29 desnaturalizado, 25,5 µg de P8 y 5 µg (a) ó 1 µg (b) de DNasa I pancreática; 4,25 µg de DNA de Ø29 desnaturalizado, 30 µg de

Figura 40. Continuación.

seroalbúmina de bovino y 5 (c), ó 1 µg (d) de DNasa I pancreática; 4,25 µg de DNA de Ø29 desnaturalizado y 25,5 µg de P8 (e); 4,25 µg de DNA de Ø29 desnaturalizado y 30 µg de seroalbúmina de bovino (g); 4,25 µg de DNA de Ø29 nativo y 30 µg de SAB (h). En el panel (f) se muestra el DNA de Ø29 (12 µg) tratado con la endonucleasa de restricción EcoRI. Al cabo de 1 minuto de incubación se añadieron 5 µl de EDTA 0,2 M para detener la reacción, y a continuación se sometieron las muestras a electroforesis en placa de agarosa como se describe en Métodos.

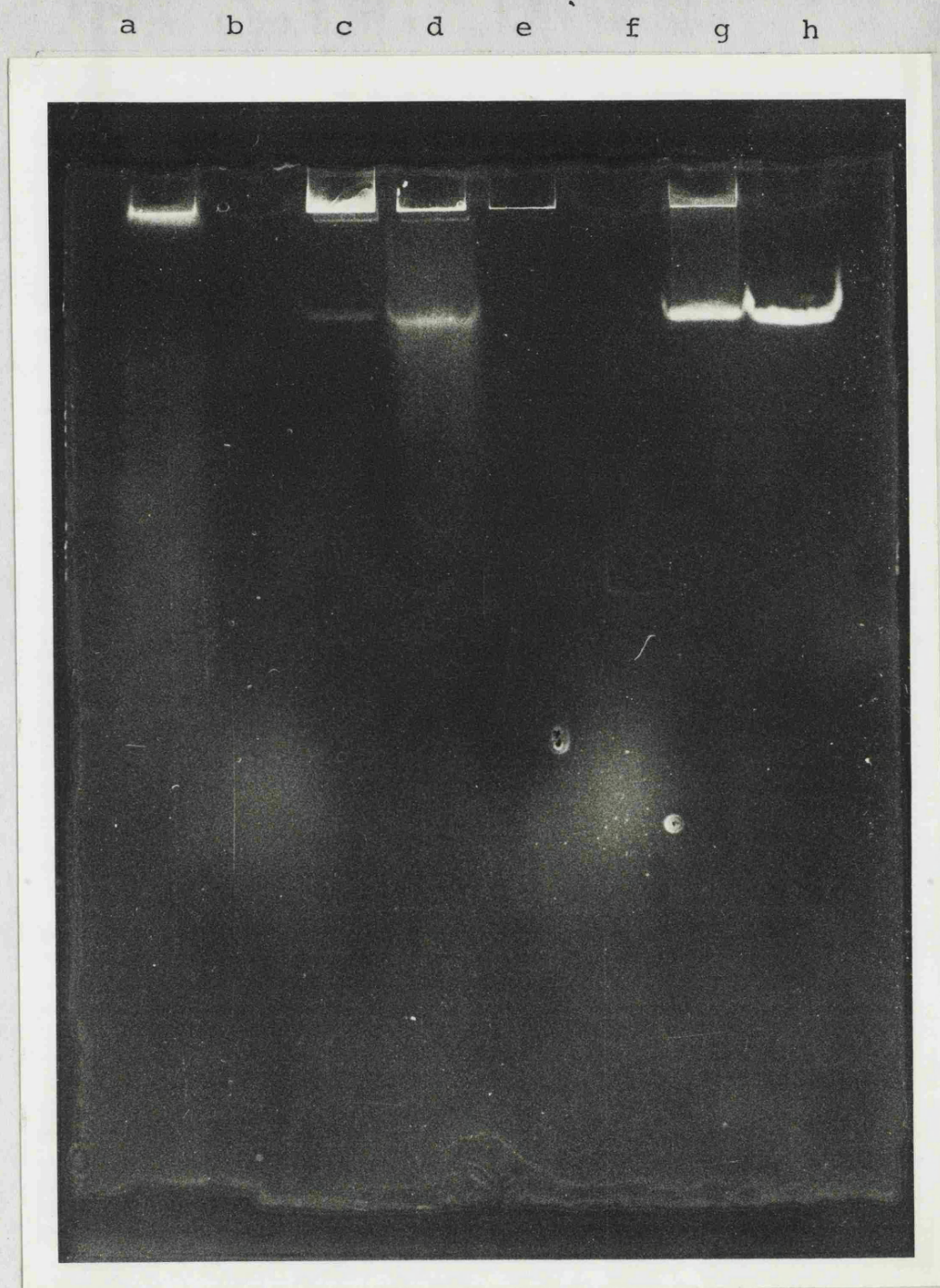


Figura 41. Efecto de la preincubación del DNA con la P8. Se incubaron en 50 μ l de una mezcla de reacción que contenía 10 μ l de SSC 0,1 X, 25 μ l de TL con ClNa 0,15 M y 15 μ l de TL $^{1/5}$, los siguientes componentes: 2,8 μ g de DNA de ϕ 29 desnaturalizado y 25,5 μ g de P8 purificada (a) y (c), 6 30 μ g de SAB (b) y (d); 2,8 μ g de DNA de ϕ 29 nativo y 25,5 μ g de P8 purificada (e) y (g), 6 30 μ g de SAB (f) y (h). Al cabo de 5 mi-

Figura 41. Continuación.

nutos a 30°C, se añadió a cada muestra 2 µl de Cl_2Mg 0,25 M, y 5 µl de DNasa I pancreática (10 µg/ml en $\text{TL}^{1/5}$) (a), (b), (e) y (f), ó 5 µl de $\text{TL}^{1/5}$ (c), (d), (g) y (h), continuándose la incubación otros 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 5 µl de EDTA 0,2 M, y a continuación se sometieron las muestras a electroforesis en placa de agarosa como se describe en Métodos.

pequeña proporción de DNA nativo no penetra en el gel cuando se incubaba en esas condiciones con la P8 sin DNasa (panel g).

3) Actividad ATPasa

Debido al hecho de que la actina se une a la miosina estimulando unas 20 veces su actividad ATPasa dependiente de Mg^{++} (130), se valoró el posible efecto de la P8 sobre la actividad ATPasa presente tanto en el pico de ClNa 0,15 M de ClNa de la columna de DNA (nativo)-celulosa, como en el pico del lavado de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa (Figura 42). Se observa que la adición de P8 al pico de ClNa 0,15 M y al del lavado no tiene ningún efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad ATPasa, lo cual parece indicar de nuevo que la P8 no es actina. Por otro lado, también se observa que la P8 purificada no presenta niveles detectables de actividad ATPasa.

E) ENSAYO DE FIJACION DE COLCHICINA POR LA P8 PURIFICADA.

Para ver si la P8 es tubulina, se estudió la capacidad de unir colchicina de la P8 purificada, propiedad que es específica de la tubulina (183). Para ello se incubó la P8 purificada con colchicina tri-

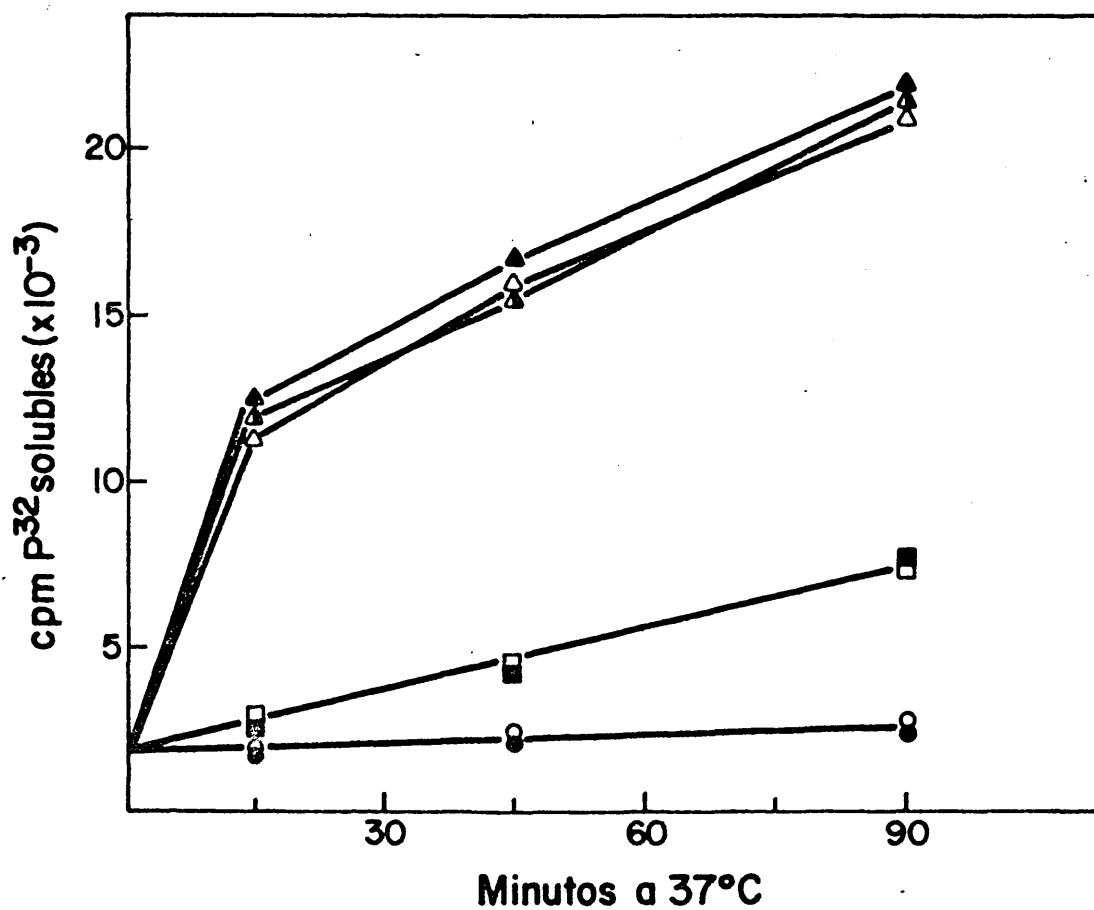


Figura 42. Valoración de ATPasa en preparados de P8.

Se incubaron 0,1 μ moles de ATP- γ -P³² (120.000 cpm), en las condiciones descritas en Métodos, con:

- : tampón de incubación
- : 15 μ g de P8 purificada
- : 30 μ g de las proteínas del pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA(nativo)-celulosa (Pico 0,15 M).
- : 30 μ g de las proteínas del pico 0,15 M mas 15 μ g de P8.

Figura 42. Continuación

- ▲ — ▲ : 200 μ g de las proteínas del lavado de la columna de DNA (desnaturalizado)-celulosa (Lavado).
- ▲ — ▲ : 200 μ g de las proteínas del lavado más 30 μ g de las proteínas del pico 0,15 M.
- ▲ — ▲ : 200 μ g de las proteínas del lavado más 30 μ g de las proteínas del pico 0,15 M, más 15 μ g de P8.

A distintos tiempos se tomaron alícuotas de los tubos de incubación, y se determinó la radiactividad de P^{32} hidrolizada como se describe en Métodos.

tiada en las condiciones de ensayo descritas para la tubulina de células de mamífero como se describe en Métodos.

El resultado de dicho experimento se muestra en la figura 43, donde se observa que la P8 purificada no fija colchicina tritiada, en unas condiciones en las que el control del experimento (extracto de cerebro de rata) presenta una actividad clara de fijación de colchicina (observese el porcentaje de colchicina que se excluye de la columna de Sephadex G-100 utilizada en el experimento). Por lo tanto, la P8 tampoco parece ser tubulina.

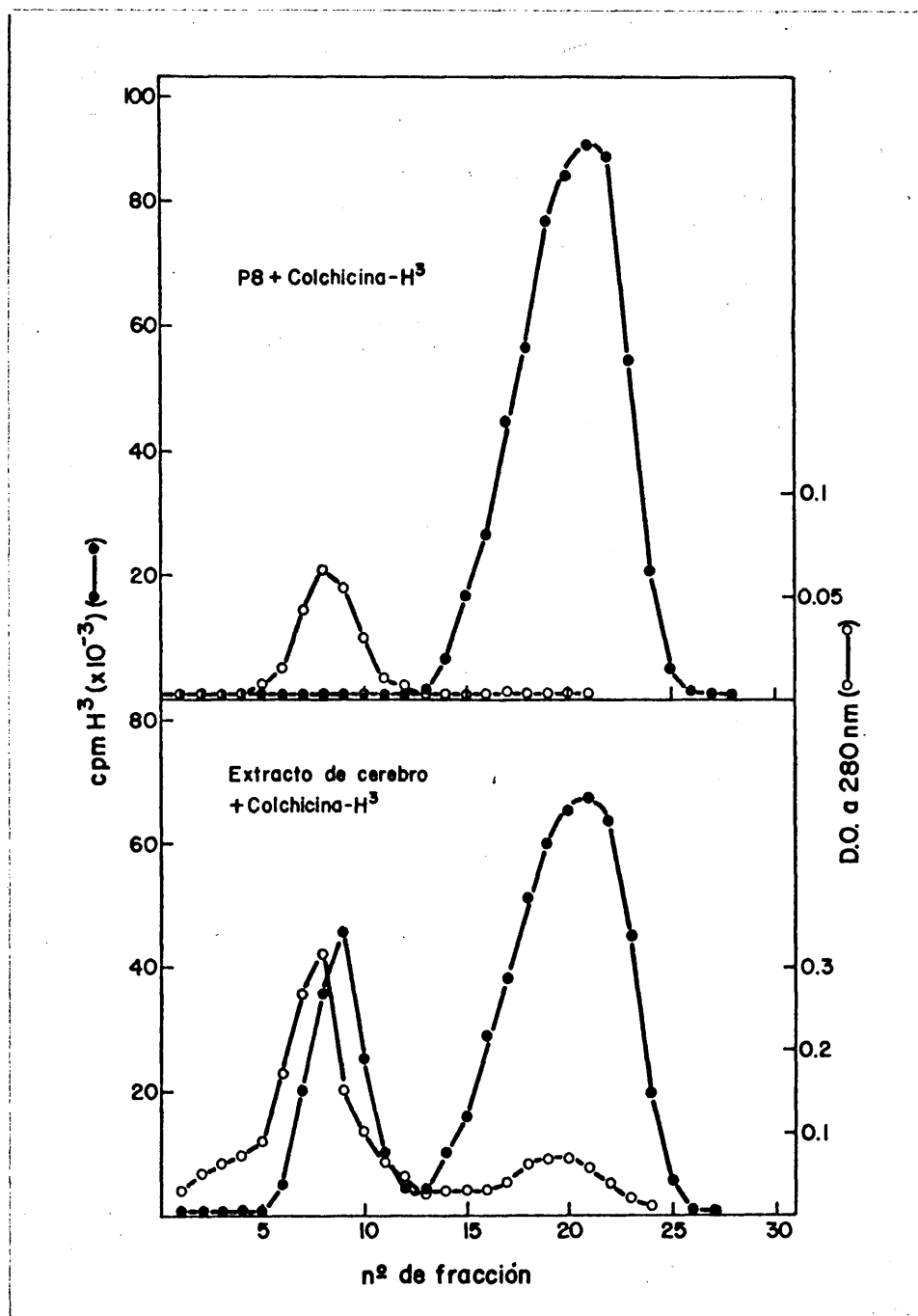


Figura 43. Ensayo de unión a colchicina de la P8. Se incubaron 5 μ Ci de colchicina-H³ (3 Ci/mmol) diluída con 5 μ l de colchicina fría 0,2 mM, con 270 μ g de P8 purificada (parte superior de la figura), ó con 840 μ g de un extracto de cerebro de rata (parte inferior de la figura) en las condiciones descritas en Métodos. A continuación se cromatografiaron las muestras en una columna de Sephadex G-

Figura 43.

100, determinándose la absorción a 280 nm y la radiactividad de las fracciones, como se describe en Métodos.

DISCUSSION

Como se mencionó en la Introducción, la proteína 8 presenta una serie de propiedades interesantes, tanto en su síntesis que depende del estado de crecimiento de la célula, como en su interacción con el DNA. Por estas razones, consideramos de interés llevar a cabo un estudio detallado de sus propiedades moleculares, y de las características de su unión al DNA, en un intento de esclarecer su función biológica.

Para ello, se desarrolló un método de purificación de la P8 de la línea transformada de fibroblastos de hamster NIL-HSV, basado en el descrito por Tsai y Green (141) para la P8 de la línea primaria de fibroblastos humanos SB. Este método se modificó con un paso adicional consistente en una cromatografía sobre fosfocelulosa. El método, en resumen, es el siguiente:

1º) Cromatografía en columna de DNA(nativo)-celulosa del extracto celular soluble.

2º) Cromatografía en columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa de las proteínas no retenidas en la columna anterior, entre las que se encuentra la P8, y

3º) Cromatografía sobre fosfocelulosa de las fracciones eluidas de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa con ClNa 0,15 M, donde la P8 es el compo-

nente mayoritario. La P8 se eluye de la columna de fosfocelulosa en una forma esencialmente homogénea con ClNa 0,1 M.

Este método permite al mismo tiempo el aislamiento de otras proteínas con afinidad por columnas de DNA-celulosa de las células NIL-HSV, aunque, debido a la variabilidad que presentaban estas proteínas en las distintas purificaciones realizadas, no nos detuvimos a estudiarlas más detenidamente. Esta falta de reproducibilidad en las proteínas presentes en los picos de ClNa 0,15 M y 2 M de las columnas de DNA-celulosa parece deberse a las distintas relaciones utilizadas entre la proteína del extracto y el DNA fijado en las columnas, así como al tamaño de las mismas, lo cual resalta la importancia crítica que pueden jugar esas variables cuando se estudian las proteínas con afinidad por columnas de DNA-celulosa.

Sin embargo, este método permite la purificación de la P8 de manera reproducible y en una escala considerablemente mayor que la utilizada por Tsai y Green, obteniéndose la proteína en una forma esencialmente homogénea, con un rendimiento final que alcanzó, en los casos más favorables de un 40 a un 50%.

En contraste con los resultados descritos por Tsai y Green, en nuestro caso no pudimos obtener en forma homogénea la P8 en el pico eluído con ClNa 0,15 M de la columna de DNA(desnaturalizado)-celulosa, por lo que fue necesario introducir un paso adicional de purificación, que consistió en una cromatografía sobre fosfocelulosa. Este paso proporcionó resultados excelentes, ya que permitió separar, por un lado, las proteínas que no tienen afinidad por fosfocelulosa (entre las que se encuentra la P8'), y, por otro, aquellas proteínas que presentan mayor afinidad por fosfocelulosa que la P8 y que quedan por tanto fijadas más fuertemente a la columna.

Por último, cabe destacar que este método permite así mismo la obtención de otra proteína con afinidad por DNA (P8') en grado considerable de pureza, aunque no de una forma totalmente reproducible, debido probablemente a las razones apuntadas más arriba. Este método de purificación podría pues, utilizarse en estudios futuros sobre la P8', proteína que presenta así mismo ciertas características interesantes, entre las que cabe destacar su afinidad específica por DNA desnaturalizado. Por una parte, la P8' no se une a co-

lumnas de DNA(nativo)-celulosa, y, por otra, parece que su unión a columnas de DNA(desnaturalizado)-celulosa es específica, ya que no presenta afinidad por fosfocelulosa, lo cual excluye la posibilidad de que su unión a columnas de DNA-celulosa se efectúe de forma inespecífica a través de los grupos fosfato del DNA.

La P8 de cultivos densos de NIL-HSV constituye más del 1% de la proteína total soluble en nuestras condiciones de extracción, lo cual representa una cantidad aproximada de 1,5 a 2 picogramos de P8 por célula (unos $7,5 \text{ a } 10 \times 10^6$ moléculas de proteína por célula).

La razón de utilizar la línea transformada (NIL-HSV) y no la normal (NIL) para la purificación de la P8 fue esencialmente de tipo técnico, ya que en cultivos densos de NIL-HSV la síntesis de la P8 es muy alta, y, al mismo tiempo, esta línea presenta una densidad de saturación mayor que la línea normal, por lo que es posible obtener mayores cantidades de proteína.

La P8 presenta un peso molecular en condiciones disociantes de unos 36.000 dalton, mientras que en estado nativo, por los dos métodos empleados, tiene un peso molecular de unos 120.000 dalton. Estos resultados sugieren que la P8 se encuentra, en estado nativo, en una forma oligomérica, probablemente un tetrámero. Si suponemos que la P8 es efectivamente un tetrámero, la pequeña discrepancia entre los valores encontrados para el peso molecular en estado nativo y en condiciones disociantes podría deberse a los distintos métodos utilizados en dichos cálculos. Teniendo en cuenta, por una parte, que el valor obtenido para el peso molecular en estado nativo coincide por los dos métodos empleados, y por otra, la forma simétrica del pico correspondiente a la P8 en la columna de Bio-gel y la gráfica perfectamente lineal de equilibrio de sedimentación, que sugiere que, en esas condiciones, la proteína se encuentra como una única especie molecular, parece probable que la discrepancia sea debida a un pequeño error en el cálculo del peso molecular del polipéptido, debido a un comportamiento anómalo de la proteína en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. En relación con esta posibilidad, cabe mencionar que la P8 no parece ser una glicoproteína,

lo cual excluye que su posible comportamiento anormal fuese debido a esta causa. También es de destacar que el valor del peso molecular en presencia de SDS comunicado para la P8 de células SB (141), 3T6, (140) y fibroblastos humanos WI-38 (146) fue, respectivamente, de 20.000, 30.000 y 33.000. Por otro lado, la P8 de NIL-HSV presenta un peso molecular aproximado de 32-33.000 (184) por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS según el método de Laemli (185). Es decir, se obtiene una cierta variabilidad en el peso molecular de la proteína dependiendo de la procedencia de la misma y del método de electroforesis utilizado.

La P8 de la línea NIL-HSV presenta una composición de aminoácidos muy similar a la de la línea primaria de fibroblastos humanos SB (141), lo cual es un argumento a favor de la posible existencia general de la proteína en distintas especies animales, con una función común y evolutivamente conservada en todos los casos, como se sugirió en la Introducción.

La P8 de NIL-HSV sometida a electroenfoque se desdobra en dos bandas con puntos isoeléctricos de 7,5 y 7,7, que son valores próximos al comunicado para la

P8 de SB por Tsai y Green (7,8), aunque, en este caso, la proteína aparecía como una sola banda (141). Esta discrepancia puede ser debida a la mayor sensibilidad de nuestro método, o bien a la presencia de urea en los geles utilizados por nosotros para calcular el punto isoeléctrico de la P8 de NIL-HSV, que podría disociar la proteína en dos componentes. Por otro lado, la presencia de dos bandas enfocadas a distintos pH puede indicar que la P8 está constituida por subunidades distintas, o que hay varias especies de proteína, o bien que existen formas modificadas de la molécula de proteína que alteran su carga neta, por ejemplo, distintos estados de fosforilación.

Con respecto a estas tres posibilidades hay que decir que la P8 no parece fosforilarse en experimentos de marcaje de células in vivo con fosfato inorgánico radiactivo en condiciones en que otras proteínas con afinidad por el DNA aparecen claramente fosforiladas, como por ejemplo, la P6 y la P8' (186). Por otra parte, la P8 analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, pero sin reducción con mercaptoetanol, aparece desdoblada en dos bandas, una de ellas de mayor movilidad electrofo-

rética que la banda única correspondiente a la proteína reducida, probablemente debido a la presencia de puentes disulfuro intracadena que hacen que el polipéptido adquiriera una forma plegada que le permite moverse con mayor rapidez en el gel de poliacrilamida, lo cual apuntaría a la existencia de subunidades distintas, una de ellas con menor proporción (o ausencia) de puentes disulfuro intracadena.

La posibilidad de que se trate en realidad de dos proteínas distintas, pero con igual movilidad en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, es decir, con cadenas polipeptídicas del mismo peso molecular, parece improbable, ya que, de ser cierta esta hipótesis, deberían ser dos proteínas que, además de su coincidencia en el peso molecular en condiciones disociantes, tendrían también el mismo peso molecular en estado nativo (120.000 daltones) e idéntico comportamiento en columnas de DNA-celulosa y fosfocelulosa.

Por todo ello, parece razonable pensar que la P8 es una proteína constituida por subunidades no idénticas, como el caso de la hemoglobina (187) o la tubulina (188), aunque de un tamaño similar, o bien que hay dos especies de proteína genéticamente relacionadas de modo similar a las isoenzimas.

La proteína 8 purificada conserva su capacidad de unión a columnas de DNA-celulosa, lo cual permite descartar la posibilidad de que la P8 necesite alguna otra proteína celular para su interacción con la DNA-celulosa. Por otra parte, la P8 purificada no queda retenida a una columna constituida únicamente de celulosa, lo que demuestra su afinidad específica por el DNA fijado a las columnas de DNA-celulosa.

Por estudios de filtración por discos Millipore, de nitrato de celulosa, se ha podido demostrar que la P8 interacciona con DNA desnaturalizado, mientras que no se detecta unión a DNA nativo, lo cual concuerda con su propiedad de unirse a las columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa, pero no a las de DNA nativo. Al mismo tiempo, se ha observado que la P8 de NIL-HSV se une a DNA desnaturalizado, tanto homólogo como heterólogo (DNA de $\phi 29$), así como al polímero sintético poli (dA-dT) desnaturalizado.

Estos resultados junto con el comportamiento de la proteína en columnas de DNA-celulosa (en las que se utiliza DNA de timo de ternera) parecen indicar que la P8 tiene afinidad específica por el estado desnaturalizado del DNA, siendo por el contrario inespecífica para el origen de éste. Esta característica sugiere que la interacción de la P8 de NIL-HSV con el DNA no

es una interacción específica de secuencia de bases, tal como la de los represores del fago lambda y del operón de la lactosa por el operador (72 ,61), sino más bien una interacción inespecífica de secuencia, como la que se observa en el caso de la proteína del gen 32 del fago T4 (82) o la del gen 5 del fago fd (86).

Por otra parte, la interacción de la P8 con el DNA desnaturalizado, tanto homólogo como heterólogo, obedece a una curva fuertemente sigmoide, lo cual, y una vez descartado el posible artefacto debido al lavado de los filtros, podría explicarse de tres maneras :

1) La proteína podría existir en varias formas de asociación, de las cuales tan sólo una es activa. Esta forma activa podría estar enriquecida por encima de una concentración crítica debido a un cambio en el equilibrio asociación-disociación, de modo similar al comportamiento del represor del fago lambda, cuya forma activa es el dímero.

2) La retención al filtro del DNA podría requerir un número mínimo de moléculas de proteína unidas al DNA, y

3) La unión de una molécula de proteína al DNA podría facilitar la interacción de una segunda molécula de proteína en un sitio adyacente al lugar de fijación de la primera, es decir, que la interacción de la P8 al DNA desnaturalizado fuese de tipo cooperativo.

La primera posibilidad no parece probable, ya que la P8 muestra el mismo peso molecular en estado nativo en el margen de concentraciones usadas en los experimentos del filtro (recuérdese que tanto por equilibrio de sedimentación, donde se usaron concentraciones de P8 relativamente altas, como por filtración en gel, con una concentración de P8 muy baja, se obtuvo el mismo peso molecular). Quedan, por tanto las dos últimas posibilidades, pero por los experimentos de filtración en discos de nitrocelulosa no se puede decidir cual es la correcta.

La interacción de la P8 con el DNA es un fenómeno muy rápido que depende de la fuerza iónica y de la temperatura, al mismo tiempo que es inhibida por los cationes Mg^{++} y Mn^{++} . El efecto de la fuerza iónica y de los cationes divalentes sobre la interacción P8-DNA sugiere que esta interacción es de tipo electrostático.

Por otra parte, el efecto de la temperatura sobre dicha interacción sugiere que, además de las fuerzas de tipo electrostático, también pueden jugar un papel importante las fuerzas hidrofóbicas en la interacción. Esta, pues, parece ser de naturaleza compleja.

La interacción P8-DNA desnaturalizado da lugar a la formación de un complejo insoluble que puede ser sedimentado a baja velocidad, es decir, que lo que se había estado detectando por la técnica de filtración por discos de nitrocelulosa no era la formación de un complejo soluble de la proteína con el DNA, sino la precipitación de éste por la P8. Este hecho indica que a la hora de interpretar los resultados obtenidos por este método hay que tener un cuidado especial, ya que, además de servir para detectar un complejo soluble entre una proteína y el DNA, tal como el formado por la RNA-Polimerasa o los represores bacterianos con el DNA (para lo que fue diseñado inicialmente el método al aprovechar la observación de que el DNA sólo pasa a través del filtro, mientras que queda retenido al mismo cuando va unido a una proteína), también es capaz de retener un DNA que forma parte de un complejo insoluble al actuar como un tamiz molecular si las partículas del precipitado son de un tamaño mayor que el poro del filtro.

La precipitación del complejo P8-DNA parece ser irreversible, ya que si se añade Mg^{++} al complejo preformado, a una concentración que es inhibidora si se añade antes o simultáneamente con la proteína y el DNA, el complejo no se solubiliza, y sigue reteniéndose en el filtro o pudiéndose sedimentar por centrifugación. De igual manera, el enfriamiento del complejo preformado a una temperatura a la cual no se produce precipitación, tampoco tiene efecto sobre el mismo.

La formación del complejo insoluble P8-DNA desnaturalizado es un fenómeno en el que la relación proteína-DNA es un factor muy crítico, ya que si se sobrepasa la cantidad de DNA óptima para la formación del complejo con una determinada cantidad de proteína, entonces se observa una inhibición. Al mismo tiempo, tanto la relación en peso P8/DNA a la cual la precipitación del complejo es óptima, como la estequiometría de la precipitación del mismo, es decir, la cantidad de proteína que coprecipita con el DNA, dependen del tamaño de éste. La relación óptima P8-DNA es menor, y se necesita menos cantidad de proteína para formar el complejo insoluble, cuanto mayor es el tamaño del DNA. Por ejemplo, para un DNA desnaturalizado de NIL-HSV con un peso molecular de uno a dos millones, la relación en peso P8/DNA a la cual

la precipitación del complejo es óptima es de 2 a 3, y la estequiometría de la precipitación de dicho complejo es de una molécula de P8 por cada 156 nucleótidos. Por el contrario, con un DNA de tamaño menor ($0,5$ a 1×10^6), los valores correspondientes son 5-6 para la relación P8/DNA, y 100 nucleótidos por cada molécula de P8, respectivamente.

A partir de estos valores se puede calcular, de una manera aproximada, la cantidad de moléculas de P8 que precipitan con cada molécula de DNA (Hay que tener en cuenta que, al ser el DNA heterogéneo, los valores calculados son valores medios).

En el caso del DNA de 1 a 2×10^6 , se tiene:

$$\begin{aligned} \frac{1 \text{ molécula de P8}}{156 \text{ nucleótidos}} &= \frac{1 \text{ molécula de P8}}{156 \times 330 \text{ (PM de un nucleótido)}} = \frac{1 \text{ molécula de P8}}{51480 \text{ (PM total)}} = \\ &= \frac{19 \text{ moléculas de P8}}{1 \text{ molécula de DNA (de } 1 \times 10^6 \text{ de PM)}} , \text{ ó } \frac{38 \text{ moléculas de P8}}{1 \text{ molécula de DNA (de } 2 \times 10^6 \text{ de PM)}} \end{aligned}$$

Es decir, que por cada molécula de DNA precipitan 19-38 moléculas de P8.

Para el DNA con un peso molecular de 0,5 a 1×10^6 , tenemos:

$$\begin{aligned} \frac{1 \text{ molécula de P8}}{100 \text{ nucleótidos}} &= \frac{1 \text{ molécula de P8}}{100 \times 330 \text{ (PM de un nucleótido)}} = \frac{1 \text{ molécula de P8}}{33.000 \text{ (PM total)}} = \\ &= \frac{15 \text{ moléculas de P8}}{1 \text{ molécula de DNA (de } 0,5 \times 10^6 \text{ de PM)}} \quad \text{ó} \quad \frac{30 \text{ moléculas de P8}}{1 \text{ molécula de DNA (de } 1 \times 10^6 \text{ de P)}} \end{aligned}$$

Es decir, que por cada molécula de DNA precipitan 15-30 moléculas de P8.

Como se puede apreciar, los valores obtenidos, son similares, lo cual podría indicar que el número de moléculas de P8 que precipitan con cada molécula de DNA es parecido, independientemente del tamaño de éste. De esta forma, tanto el efecto del tamaño del DNA, como la dependencia de la relación P8/DNA, en la formación del complejo insoluble P8-DNA, se podrían explicar si se supone que para que tenga lugar la precipitación de dicho complejo se necesita un número crítico de moléculas de proteína, que probablemente oscilará entre 15 y 40, por debajo del cual no ocurre dicha precipitación. Al aumentar el número de moléculas de DNA (al aumentar la concentración de éste, o al ser de un tamaño más pequeño) el número de moléculas de proteína que corresponderían por molécula de DNA se haría menor, y, por lo tanto, se observaría una inhibición

de la precipitación del complejo, siendo necesario aumentar la cantidad de proteína para que cada molécula de DNA pudiera unir un número suficiente de moléculas de proteína que diese lugar a la formación del complejo insoluble.

La P8 interacciona también con poli A y con RNA homólogo heterogéneo de forma similar a como lo hace con el DNA desnaturalizado, aunque para detectar dicha interacción es necesario reducir la fuerza iónica del tampón de incubación, de igual manera que ocurre con el poli (dA-dT) desnaturalizado. Esto puede ser debido al pequeño tamaño del RNA y de los polímeros sintéticos utilizados. Estos resultados indican que la P8 no es capaz de distinguir entre un polidesoxirribonucleótido y un polirribonucleótido.

Por otro lado, la forma de las gráficas de retención del poli A a filtros Millipore apoyan la hipótesis expuesta anteriormente sobre la necesidad de un número crítico de moléculas de P8 para producir la precipitación del complejo P8-ácido nucleico, ya que al aumentar la cantidad de poli A se produce un desplazamiento hacia la derecha (zona de mayor concentración de proteína) de la curva de retención del poli A, indi-

cando que se necesita más cantidad de P8 para formar el complejo probablemente debido a que se produce un cambio en la relación P8/poli A.

La función biológica de la proteína 8 de NIL-
HSV no se conoce todavía, aunque, teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, se pueden hacer una serie de consideraciones.

En primer lugar, la P8 se encuentra en gran cantidad en la célula, lo cual sugiere que su función no es catalítica, y apunta más bien a una función de tipo estructural o que requiera cantidades estequiométricas.

Entre las proteínas conocidas que están presentes en grandes cantidades en las células eucarióticas en cultivo, se encuentran la miosina, la actina, la tropomiosina y la tubulina. Estas proteínas juegan un papel estructural dando rigidez a la célula, al constituir una especie de esqueleto interno, que permite a la célula anclarse al sustrato. Al mismo tiempo, dichas proteínas proporcionan motilidad y una cierta plasticidad a las células (47-51). La tubulina interviene además en la formación del uso acromático durante la mitosis (183).

Por otra parte, se han encontrado recientemente dichas proteínas asociadas a la cromatina en núcleos de Phy-sarum polycephalum, células Hela y fibroblastos embrionarios de ratón (130,131), donde pudieran ejercer una función, no sólo estructural, sino también reguladora de la condensación (y consiguiente inactivación) de la cromatina, dependiendo del estado fisiológico de la célula.

Se consideró la posibilidad de que la P8 fuese alguna de estas proteínas. Por un lado, la P8 no parece ser miosina por su peso molecular (189), ni tropomiosina debido a la distinta composición en aminoácidos de las dos proteínas (190). Por otra parte, la P8 no presenta actividad de fijación de colchicina en unas condiciones experimentales en que se obtiene un resultado positivo utilizando un extracto de cerebro de rata, donde la tubulina se encuentra abundantemente, por lo que se puede descartar la posibilidad de que la P8 sea tubulina. Por otra parte, la P8 no inhibe la actividad de la DNasa I en unas condiciones en las que la actina presenta un efecto fuertemente inhibidor, ya que se une al enzima en proporción 1:1, inactivándolo (182). Al mismo tiempo, la P8 no estimula la actividad ATPasa dependiente de Mg^{++} , presente en el extracto ce-

lular y en el pico de ClNa 0,15 M de la columna de DNA (nativo)-celulosa, mientras que es sabido que la actina se une a la miosina y estimula su actividad ATPasa dependiente de Mg^{++} unas 20 veces (130). De estos resultados se deduce que la P8 tampoco parece ser actina.

La posibilidad de que la P8 fuese una proteína similar a la proteína del gen 32 del bacteriófago T4, es decir, una "unwinding protein" que redujese la temperatura de fusión del DNA de doble banda y, por lo tanto, facilitase la desnaturalización del DNA, era muy sugestiva, debido a que las dos proteínas poseen una serie de características comunes, tales como su afinidad específica por DNA desnaturalizado, su abundancia en la célula, su peso molecular en presencia de SDS y su posible unión cooperativa a DNA de una sola banda. Por lo tanto, se ensayó la capacidad de la P8 de desnaturalizar distintas clases de polidesoxiribonucleótidos de doble cadena : DNA de NIL-HSV, DNA de Ø29 y poli (dA-dT), siguiendo la absorción a 260 nm de la mezcla DNA-P8. Sin embargo, en las distintas condiciones empleadas no se pudo detectar un aumento de la absorción a 260 nm debida al efecto hipercrómico, así como tampoco se observó una facilitación de la renaturalización del DNA por la P8. Por lo tanto, la P8 no

parece ser una proteína con función similar a la del gen 32 de T4. Es de destacar en relación con esto que la P8 se une más débilmente a columnas de DNA (desnaturalizado)-celulosa, que las "unwinding proteins" descritas tanto en procarióticos como en eucarióticos (82,87, 90,139), y además posee la propiedad de que su interacción con el DNA desnaturalizado da lugar a la formación de un complejo insoluble, cosa que no ocurre con las proteínas citadas anteriormente.

Por otro lado, no sabemos con certeza cual es la localización intracelular de la P8, aunque por experimentos con núcleos purificados en presencia de detergentes no iónicos, parece que la proteína se encuentra fundamentalmente en el citoplasma (191). Sin embargo, en estos experimentos no se pudo descartar la posibilidad de que la P8, aún siendo nuclear, se escape de los núcleos durante la preparación de estos. La P8 podría también existir en el núcleo en una forma unida fuertemente a la cromatina, que no se solubilizase bajo las condiciones de extracción utilizadas hasta ahora. Para tratar de aclarar el problema de la localización intracelular de la P8 hemos preparado anticuerpos contra la proteína purificada, y estamos estudiando actualmente su localización "in situ" por métodos de inmunofluorescencia.

Si mediante este método siguiera detectándose la P8 principalmente en el citoplasma, se plantearía la cuestión del significado de su interacción con el DNA. En principio cabrían dos posibilidades.

La primera es que la P8 sólo interaccionaría con el DNA al destruirse la membrana nuclear durante la mitosis. Teniendo en cuenta la precipitación que se produce al interaccionar el DNA con la P8, podría sugerirse que dicha proteína jugase un papel en la condensación cromosómica. En relación con esta hipótesis cabe mencionar que los experimentos de Johnson y Rao (192) de fusión de células en distintas fases del ciclo celular demuestran que cuando se funden células en mitosis con células en interfase se produce una condensación prematura de los cromosomas de estas últimas. Estos experimentos sugieren, además, que una proteína o proteínas podrían jugar un papel en dicha condensación.

La segunda posibilidad es que la función de la P8 esté relacionada, no con el DNA, sino con el RNA. Es sabido que el RNA se transcribe en el núcleo en una forma de alto peso molecular, que rápidamente aparece aso-

ciado a proteína formando unas partículas que se han llamado "informosomas" (193,194). La parte proteica de estas partículas está constituida por varias subunidades (20-40) de una proteína mayoritaria que tiene un peso molecular de 33-40.000 daltones en presencia de SDS. Se piensa que el RNA heterogéneo nuclear se procesa de esta forma y se transporta al citoplasma como RNA mensajero (195). En el citoplasma, el RNA se encuentra también formando partículas de ribonucleoproteína, que pueden ser de dos clases: el mRNA asociado a los polisomas, que está unido fundamentalmente a una proteína de unos 73.000 daltones por su extremo 3', donde se encuentra la cadena de poli A, y a otras proteínas por su extremo 5', proteínas que tienen pesos moleculares que van desde 50.000 hasta 130.000 (196,197); por otro lado, se encuentra también en el citoplasma el mRNA que no está asociado a los ribosomas, y que forma parte de unas partículas de ribonucleoproteína similares a los "informosomas" del núcleo, cuya parte proteica está constituida por varias proteínas de pesos moleculares que varían en el margen de 30.000 a 50.000 daltones (198).

Además, se ha descrito en el citoplasma de distintas células animales (hígado de rata, reticulocitos de conejo y células HeLa) un factor de naturaleza proteica con capacidad de unión a RNA y que podría participar en la formación de los "informosomas" (199,200). Recientemente se ha encontrado que este factor está constituido por varias proteínas, dos de las cuales, con pesos moleculares de 36.000 y 42.000 daltones en presencia de SDS, parecen ser las responsables de la unión al RNA. La proteína de 42.000 posee la propiedad de formar un complejo insoluble con un DNA de alto peso molecular añadido a la fracción citoplásmica (201). De lo expuesto anteriormente, y teniendo en cuenta la propiedad que tiene la P8 de unirse a RNA y a poli A, es atractiva la posibilidad de que la P8 pudiera ser la proteína que forma parte de los "informosomas". Actualmente se está intentando purificar en nuestro laboratorio estas partículas, tanto del núcleo como del citoplasma de células NIL-HSV, con el fin de determinar si la P8 se encuentra en dichas partículas.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un método de purificación en gran escala de la proteína 8 de la línea establecida de fibroblastos transformados de hamster NIL-HSV. Este método permite obtener la proteína en un grado de pureza que oscila entre el 95 y el 100%, con un rendimiento de un 25-50%.
2. La P8 de cultivos densos de NIL-HSV constituye más del 1% de la proteína celular total soluble, lo que corresponde a un número aproximado de 7,5 a 10 millones de moléculas de P8 por célula.
3. Se han estudiado algunas de las propiedades físicoquímicas de la proteína 8 purificada. El peso molecular de la P8 en condiciones disociantes es de unos 36.000 daltones, mientras que, en estado nativo, se obtiene un valor de unos 120.000, lo que indica que la P8 nativa presenta una estructura oligomérica que probablemente es un tetrámero. Por otra parte, se ha encontrado cierta evidencia de que las subunidades de la P8 no son idénticas. La P8 no tratada con mercaptoetanol da lugar a la aparición de dos bandas en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, una de ellas con mayor movilidad que la P8 reducida, lo que sugiere que

alguna(s) subunidad(s) de la P8 posee(n) puentes disulfuro intracadena. Por otra parte, este experimento indica que la P8 no presenta puentes disulfuro intercadena. La P8 sometida a electroenfoque en placa de poli-acrilamida en presencia de urea se desdobra en dos bandas con puntos isoeléctricos de 7,5 y 7,7. También se ha determinado la composición de aminoácidos de la P8.

4. Se ha estudiado asimismo las características de la interacción de la P8 con los ácidos nucleicos. La P8 interacciona in vitro con el DNA desnaturalizado, tanto homólogo como heterólogo, pero no con DNA nativo. La proteína se une también a RNA homólogo heterogéneo y al polímero sintético poli A. En todos los casos estudiados, las gráficas de retención a los filtros de nitrocelulosa de los distintos ácidos nucleicos obedecen a curvas fuertemente sigmoides, lo cual puede ser debido a que se necesita un número mínimo de moléculas de proteína para que el complejo proteína-ácido nucleico quede retenido en el filtro, o bien a que la interacción de la P8 con los polinucleótidos es de tipo cooperativo. Los resultados obtenidos indican que la P8 presenta una afinidad específica por polinucleótidos de una sola cadena aunque la interacción parece ser inespecífica de

secuencia de bases.

5. La interacción de la P8 con el DNA desnaturalizado es un fenómeno muy rápido que depende fuertemente de la temperatura y de la fuerza iónica, siendo inhibida por los cationes divalentes Mg^{++} y Mn^{++} . Estos resultados sugieren que la interacción P8-DNA desnaturalizado es de naturaleza compleja, interviniendo en la misma tanto fuerzas electrostáticas como hidrofóbicas.
6. La interacción de la P8 con ácidos nucleicos de una sola banda da lugar a la formación de un complejo insoluble, que, una vez formado es irreversible. El DNA que forma parte de este complejo está protegido parcialmente del ataque por la DNasa I pancreática.
7. En la formación del complejo insoluble P8-DNA desnaturalizado, la relación P8/DNA es un factor muy crítico: con una cantidad fija de proteína, si se aumenta el número de moléculas de DNA se produce una inhibición en la formación del complejo. Estos resultados parecen indicar que, para la formación de dicho complejo, se necesita un número crítico de moléculas de proteína, por debajo de cual no ocurre la precipitación del mismo.

8. Se ha estudiado la estequiometría de la precipitación del complejo P8-DNA desnaturalizado homólogo, obteniéndose un valor para la saturación del DNA por la proteína de 100 a 160 nucleótidos por cada molécula de proteína, dependiendo del tamaño del DNA, ó de 15 a 40 moléculas de proteína por molécula de DNA. Este último valor representa probablemente el número mínimo de moléculas de P8 que es necesario para precipitar una molécula de DNA, y parece ser independiente del tamaño de ésta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gurdon, J. "Adult frogs derived from the nuclei of somatic cells". Develop. Biol. 4, 256-267 (1962).
- 2.- Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E. "Evidence for the complete DNA-dependence of RNA synthesis in isolated thymus nuclei". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 48, 1590-1596 (1962).
- 3.- Paul, J. and Gilmour, R.S. "Template activity of DNA is restricted in chromatin". J. Mol. Biol. 16, 242-245 (1966).
- 4.- McCarthy, B.J. and Hoyer, B.H. "Identity of DNA and diversity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 915-922 (1964).
- 5.- Mueller, G.C. "Biochemical events in the animal cell cycle". Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exptl. Biol. 28, 1780-1789 (1969).
- 6.- Mitchison, J.M. "The Biology of the cell cycle". Cambridge Univ. Press, London and New York (1971).
- 7.- Stein, G.S. and Baserga, R. "Nuclear proteins and the cell cycle". Advan. Cancer Research 15, 287-330 (1972).
- 8.- Clarkson, B.D. "The survival value of the dormant state in neoplastic and normal cell populations". In, Control of proliferation in animal cells.- Clarkson, Baserga; Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation. Pag. 945-972 (1974).
- 9.- Tooze, J. (Editor) "The molecular biology of tumor viruses". Cold Spring Harbor Laboratory (1973).

- 10.- Schrader, J.W., Cunningham, B.A. and Edelman, G.M. "Functional interactions of viral and histocompatibility antigens at tumor surfaces". Proc. Natl.Acad.Sci.U.S., 72, 5066-5070 (1975).
- 11.- Nelson, P., Christian, C. and Nirenberg, M. "Synapse formation between clonal neuroblastoma X glioma hybrid cells and striated muscle cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 73, 123-127 (1976).
- 12.- Smith, J.A. and Martin, L. "Do cell cycle?"Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 70, 1263-1267 (1973).
- 13.- Basilico, C. and Meiss, H.K. "Methods for selecting and studying temperature-sensitive mutants of BHK-21 cells". Methods in Cell Biology, 8, 1-22 (1974).
- 14.- Huberman, J.A. and Riggs, A.D. "On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes" J. Mol. Biol. 32, 327-341 (1968).
- 15.- Watson, J.D. "The regulation of DNA synthesis in eukaryotes". Advances in Cell Biol. 2, 1-46 (1971).
- 16.- Manck, J.C. and Green, H. "Regulation of RNA synthesis in fibroblast during transition from resting to growing state". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 2819-2822 (1973).
- 17.- Stein, G.S. and Baserga, R. "Continued synthesis of non-histone chromosomal proteins during mitosis". Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 715-722 (1970).

- 18.- Rapin, A.M.C. and Burger, M.M. "Tumor cell surfaces : general alterations detected by agglutinins". Adv. Cancer Res. 20, 1-91 (1974).
- 19.- Castor, L.N. "Cell contact and cell division". En, "Developmental aspects of carcinogenesis and immunity". Academic Press, New York, San Francisco, London (1974).
- 20.- Todaro, G.J., Green, H. and Goldberg, B. "Transformation of properties of an established cell line by SV40 and polyoma virus". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51, 66-73 (1964).
- 21.- Castor, L.N. "Contact regulation of cell division in an epithelial-like cell line". J. Cell Physiol. 72, 161-172 (1968).
- 22.- Dulbecco, R. and Stoker, M.G.P. "Conditions determining initiation of DNA synthesis in 3T3 cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 66, 204-210.
- 23.- Todaro, G.J. and Green, H. "Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines". J. Cell Biol. 17, 299-312 (1963).
- 24.- Dulbecco, R. "Topoinhibition and serum requirement of transformed and untransformed cells". Nature, 227, 802-806 (1970).
- 25.- Stocker, M.G.P. and Rubin, H. "Density dependent inhibition of cell growth in culture". Nature 215, 171-172 (1967).
- 26.- Macieira-Coelho, A. "Dissociation between inhibition of movement and inhibition of division in RSV. Transformed human fibroblasts". Expt. Cell Research, 47, 193-200 (1967).

- 27.- Ceccarini, C. and Eagle, H. "pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 68, 229-233 (1971).
- 28.- Rubin, H. "pH and population density in the regulation of animal cell multiplication". J. Cell Biol. 51, 686-702 (1971).
- 29.- Bürk, R.R. "Growth inhibitor of Hamster fibroblast cell". Nature 212, 1261-1262 (1966).
- 30.- Dulak, N.C. and Temin, H.M. "A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts". J. Cell Physiol. 81, 153-160 (1973).
- 31.- Paul, D., Lipton, A. and Klinger, I. "Serum factor requirements of normal and simian virus 40-transformed 3T3 mouse fibroblasts". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 68, 645-648 (1971).
- 32.- Holley, R.W. and Kiernan, J.A. "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 60, 300-304 (1968).
- 33.- Pierson, R.W. and Temin, H.M. "The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity". J. Cell Physiol. 79, 319-329 (1972).
- 34.- Thrash, R.C. and Cunningham, D.D. "Stimulation of division of density inhibited fibroblasts by glucocorticoids". Nature 242, 399-401 (1973).

- 35.- Dulbecco, R. and Elkington, J. "Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures". *Nature*, 246, 197-199 (1973).
- 36.- Stoker, M.G.P. "Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth". *Nature* 246, 200-203 (1973).
- 37.- Munyon, W., Kraiselburd, E., Davis, D. and Mann, J. "Transfer of thymidine kinase to thymidine kinaseless L cells by infection with ultraviolet-irradiated herpes simplex virus". *J. Virol.* 7, 813-820 (1971).
- 38.- Rapp, F. "Virus-mediated transformation of mammalian cells" En, "Developmental aspects of carcinogenesis and immunity". Academic Press, N. York, San Francisco, London. Pág. 125-136 (1974).
- 39.- Eagle, H., Foley, G.E., Koprowski, H., Lazarus, H., Levins, E.M. and Adams, R.A. "Growth characteristics of virus-transformed cells. Maximum population density, growth in soft agar and xenogeneic transplantability". *J. Expt. Med.* 131, 863-879 (1970).
- 40.- Holley, R.W. "Control of growth of mammalian cells in cell culture". *Nature* 258, 487-490. (1975).
- 41.- Todaro, G. and Green, H. "An essay for transformation by SV40" *Virology*, 23, 117-119 (1964).
- 42.- Todaro, G. and Green, H. "High frequency of SV40 transformation of mouse cell line 3T3". *Virology*, 28, 756-759 (1966).
- 43.- Tooze, J. (Editor). "The molecular biology of tumor viruses". Cold Spring Harbor Laboratory, pág. 102 (1973).

- 44.- Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S. and Waxman, V. "Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells". Int. J. Cancer, 3, 683-689 (1968).
- 45.- Burger, M.M. "A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 62, 994-1001 (1969).
- 46.- Macpherson, I. and Montaigner, L. "Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus". Virology, 23, 291-294 (1964).
- 47.- Goldman, R.D., Lazarides, E., Pollack, R. and Weber, K. "The distribution of actin in non muscle cells". Expt. Cell Research, 90, 333-344 (1975).
- 48.- Weber, K., Pollack, R. and Bibring, T. "Antibody against tubulin : the specific visualization of cytoplasmic microtubules in tissue culture cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72, 459-463 (1975).
- 49.- Lazarides, E. and Burridge, K. " α -actinin : immunofluorescent localization of a muscle structural protein in non muscle cells". Cell, 6, 289-298 (1975).
- 50.- Pollack, R., Osborn, M. and Weber, K. "Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72, 994-998 (1975).
- 51.- Brinkley, B.R., Fuller, G.M. and Highfield, D.P. "Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture : analysis by tubulin antibody immunofluorescence". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72, 4981-4985 (1975).

- 52.- Hynes, R.O. "Alteration of cell-surface proteins by viral transformation and by proteolysis". Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 70, 3170-3174 (1973).
- 53.- Salzberg, S. and Green, M. "Surface alterations of cells carrying RNA tumor virus genetic information". Nature New Biol. 240, 116-118 (1972).
- 54.- Burger, M.M. and Martin, G.S. "Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus by wheat germ agglutinin and concanavalin A". Nature New Biol. 237, 9-12 (1972).
- 55.- Shoham, J. and Sachs, L. "Different cyclic changes in the surface membrane of normal and malignant transformed cells". Expt. Cell Res. 85, 8-14 (1974).
- 56.- Nicolson, G.L. "Difference in topology of normal and tumor cell membranes shown by different surface distributions of ferritin-conjugated concanavalin A". Nature New Biol. 233, 244-246 (1971).
- 57.- Levine, A.J. and Burger, M.M. "A working hypothesis explaining the maintenance of the transformed state by SV40 and polyoma". J. Theor. Biol. 37, 435-446 (1972).
- 58.- Von Hippel, P.H. and McGhee, J.D. "DNA-protein interactions". Ann. Rev. Biochem. 41, 231-300 (1972).
- 59.- Jacob, F. and Monod, J. "Genetic regulatory mechanism in the synthesis of protein". J. Mol. Biol. 3, 318-356 (1961).

- 60.- Gilbert, W. and Müller-Hill, B. "The lac operator is DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58, 2415-2421 (1967).
- 61.- Riggs, A.D., Bourgeois, S., Newby, R.F. and Cohn, M. "DNA binding of the lac repressor". J. Mol. Biol. 34, 365-368 (1968).
- 62.- Jobe, A., Riggs, A.D. and Bourgeois, S. "Lac repressor-operator interaction. V. Characterization of super- and pseudo-wild type repressors". J. Mol. Biol. 64, 181-199 (1972).
- 63.- Myers, G.L. and Sadler, J.R. "Mutational inversion of control of the lactose operon of Escherichia coli". J. Mol. Biol. 58, 1-28 (1971).
- 64.- Steitz, T.A. "The lac repressor protein: molecular shape, subunit structure and proposed model for operator interaction based on structural studies of microcrystals". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 71, 593-597 (1974).
- 65.- Beyreuther, K. "The amino acid sequence of lac repressor". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 3576-3580 (1973).
- 66.- Riggs, A.D., Suzuki, H. and Bourgeois, S. "Lac repressor-operator interaction. I. Equilibrium studies". J. Mol. Biol. 48, 67-83 (1970).
- 67.- Hershey, J. "The bacteriophage Lambda". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1971).
- 68.- Kaiser, A.D. and Jacob, F. "Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization". Virology 4, 509-521 (1957).

- 69.- Meyer, B.J., Kleid, D.G. and Ptashne, M. " λ repressor turns off transcription of its own gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72, 4785-4789 (1975).
- 70.- Maniatis, T. and Ptashne, M. "A DNA operator-repressor system". Scientific American, 234, 64-76 (1976).
- 71.- Pirrotta, V., Chadwick, P. and Ptashne, M. "Active form of two coliphage repressors". Nature 227, 41-44 (1970).
- 72.- Chadwick, P., Pirrotta, V., Steinberg, R., Hopkins, N. and Ptashne, M. "The λ and 434 phage repressors". Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 35, 283-294 (1970).
- 73.- Emmer, M., DeCrombrugge, B., Pastan, I. and Perlman, R. "Cyclic AMP receptor protein of E. coli : its role in the synthesis of inducible enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 66, 480-487 (1970).
- 74.- Zubay, G., Schwartz, D. and Beckwith, J. "Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes : A positive control system". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 66, 104-110 (1970).
- 75.- Anderson, W.B., Schneider, B., Emmer, M., Perlman, R.L. and Pastan, I. "Purification and properties of the cyclic adenosine 3', 6'-monophosphate receptor protein which mediates cyclic adenosine 3', 6'-monophosphate-dependent gene transcription in Escherichia coli". J. Biol. Chem. 246, 5929-5937 (1971).
- 76.- Varmus, H.E., Perlman, R.L. and Pastan, I. "Regulation of lac transcription in Escherichia coli by cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate". J. Biol. Chem. 245, 6366-6372 (1970).

- 77.- Parks, J., Gottesman, M., Perlman, R.L. and Pastan, I. "Regulation of galactokinase synthesis by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in cell-free extracts of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 246, 2419-2424 (1971).
- 78.- Epstein, R.H. "Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T4D". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 375-394 (1963).
- 79.- Tomizawa, J., Anraku, N., Iwama, Y. "Molecular mechanisms of genetics recombination in bacteriophage. VI. A mutant defective in the joining of DNA molecules". J. Mol. Biol. 21, 247-254 (1966).
- 80.- Snustad, D.P. "Dominance interactions in Escherichia coli cells mixedly infected with bacteriophage T4D wild-type and amber mutants and their possible implications as to type of gene-product function : catalytic vs stoichiometric". Virology 35, 550-563 (1968).
- 81.- Alberts, B.M., Amodio, F.J., Jenkins, M., Gutman, E.D. and Ferris, F.L. "Studies with DNA-cellulose chromatography. I.-DNA-binding proteins from Escherichia coli". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 289-305 (1968).
- 82.- Alberts, B.M. and Frey, L. "T4 bacteriophage gene 32 : a structural protein in the replication and recombination of DNA". Nature 227, 1313-1318 (1970).

- 83.- Alberts, B.M. "In nucleic acid-protein interactions and nucleic acid synthesis in viral infection". Ed. D.W. Ribbons, J.F. Woessner, J. Schultz. Amsterdam : North-Holland (1971).
- 84.- Delius, H., Mantell, N.J. and Alberts, B.M. "Characterization by electron microscopy of the complex formed between T4 bacteriophage gene 32-protein and DNA". J. Mol. Biol. 67, 341-350 (1972).
- 85.- Huberman, J.A., Kornberg, A. and Alberts, B.M. "Stimulation of T4 bacteriophage DNA-polymerase by the protein product of T4 gene 32". J. Mol. Biol. 62, 39-52 (1971).
- 86.- Oey, J.L. and Knippers, R. "Properties of the isolated gene 5 protein of bacteriophage fd". J. Mol. Biol. 68, 125-138 (1972).
- 87.- Alberts, B.M., Frey, L. and Delius, H. "Isolation and characterization of gene 5 protein of filamentous bacterial viruses". J. Mol. Biol. 68, 139-152 (1972).
- 88.- Cavalieri, S.J., Neet, K.E. and Goldthwait, D.A. "Gene 5 protein of bacteriophage fd : a dimer which interacts co-operatively with DNA". J. Mol. Biol. 102, 697-711 (1976).
- 89.- Mazur, B.J. and Model, P. "Regulation of coliphage f1 single-stranded DNA synthesis by a DNA-binding protein". J. Mol. Biol. 78, 285-300 (1973).
- 90.- Sigal, N., Delius, H., Kornberg, T., Gefter, M.L. and Alberts, B.M. "A DNA-unwinding protein isolated from Escherichia coli : its interaction with DNA and with DNA polymerases". Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 69, 3537-3541 (1972).

- 91.- Molineux, I.J. and Gefter, M.L. "Properties of the Escherichia coli DNA-binding (unwinding) protein interaction with nucleolytic enzymes and DNA". J. Mol. Biol. 98, 811-825 (1975).
- 92.- Weiner, J.H., Bertsch, L.L. and Kornberg, A. "The deoxyribonucleic acid unwinding protein of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 250, 1972-1980 (1975).
- 93.- Geider, K. and Kornberg, A. "Conversion of the M13 viral single strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins". J. Biol. Chem. 249, 3999-4005 (1974).
- 94.- Molineux, I.J., Friedman, S. and Gefter, M.L. "Purification and properties of the Escherichia coli deoxyribonucleic acid-unwinding protein. Effects on deoxyribonucleic acid synthesis in vitro". J. Biol. Chem. 249, 6090-6098 (1974).
- 95.- Stedman, E. and Stedman, E. "Probable function of histone as a regulator of mitosis". Nature 152, 556 (1943).
- 96.- Huang, R.C. and Bonner, J. "The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 1216-1221 (1962).
- 97.- Allfrey, V.G., Littau, V.C. and Mirsky, A.E. "On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 414-421 (1963).

- 98.- DeLange, R.J. and Smith, E.L. "Histones : structure and function". Ann. Rev. of Biochem. 40, 279-314 (1971).
- 99.- Robbins, E. and Borum, T.W. "The cytoplasmic synthesis of histones in HeLa cells and its temporal relationship to DNA replication". Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 57, 409-416 (1967).
- 100.- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G. "Processing of newly synthesized histone molecules". Science 190, 117-127 (1975).
- 101.- Olins, D.E. and Olins, A.L. "Spheroid chromatin units (V bodies)". Science 183, 330-332 (1974).
- 102.- Noll, M. "Subunit structure of chromatin". Nature 251, 249-251 (1974).
- 103.- Axel, R. "Cleavage of DNA in nuclei and chromatin with staphylococcal nuclease". Biochemistry 14, 2921-2925 (1975).
- 104.- Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. "Folding of the DNA double helix in chromatin-like structure from simian virus 40". Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 72, 1843-1847 (1975).
- 105.- Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. "Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit". Cell, 4, 281-300 (1975).
- 106.- Varshavsky, A.J. and Georgiev, G.P. "Studies on chromatin. V. A model for the structure of chromatin subunit". Molecular Biology Reports, 2, 255-262 (1975).
- 107.- Crick, F.H.C. and Klug, A. "Kinky helix. DNA in chromatin is highly folded. Is it kinked? and

- does it kink in other situations?". *Nature* 255, 530-533 (1975).
- 108.- Paul, J. and Gilmour, R.S. "Organ-specific restriction of transcription in mammalian chromatin". *J. Mol. Biol.* 34, 305-316 (1968).
- 109.- Dingman, C.W. and Sporn, M.B. "Studies on chromatin. I. Isolation and characterization of nuclear complexes of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and protein from embryonic and adult tissues of the chicken". *J. Biol. Chem.* 239, 3483-3492 (1964).
- 110.- Elgin, S. and Bonner, J. "Limited heterogeneity of the major nonhistone chromosomal proteins". *Biochemistry* 9, 4440-4447 (1970).
- 111.- Teng, C.S., Teng, C.T. and Allfrey, V.G. "Studies of nuclear acidic proteins. Evidence for their phosphorylation, tissue specificity, selective binding to the deoxyribonucleic acid, and stimulatory effects on transcription". *J. Biol. Chem.* 246, 3597-3609 (1971).
- 112.- Rickwood, D., Riches, P.G. and MacGillivray, A.J. "Studies of the in vitro" phosphorylation of chromatin non-histone proteins in isolated nuclei". *Biochim. Biophys. Acta* 299, 162-171 (1973).
- 113.- Spelsberg, T.C. and Hnilica, L. "Deoxyribonucleoproteins and the tissue-specific restriction of the deoxyribonucleic acid in chromatin". *Biochem. J.* 120, 435-438 (1970).
- 114.- Van den Broek, H., Sevall, J.S., Nooden, L. and Bonner, J. "Isolation, purification, and fractionation of non histone chromosomal proteins". *Biochemistry* 12, 229-236 (1973).

- 115.- Kleinsmith, L.J., Heidema, J. and Carroll, A.
"Specific binding of rat liver nuclear proteins to DNA". *Nature*, 226, 1025-1026 (1970).
- 116.- Shelton, K.R. and Allfrey, V.G. "Selective synthesis of a nuclear acidic protein in liver cells stimulated by cortisol". *Nature* 228, 132-134 (1970).
- 117.- Teng, C.S. and Hamilton, T.H. "Regulation by estrogen of organ-specific synthesis of nuclear acidic proteins". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 1231-1238 (1970).
- 118.- Enea, V. and Allfrey, V.G. "Selective synthesis of liver nuclear acidic proteins following glucagon administration in vitro". *Nature* 242, 265-267 (1973).
- 119.- Stein, G. and Baserga. "The synthesis of acidic nuclear proteins in the prereplicative phase of the isoproterenol-stimulated salivary gland". *J. Biol. Chem.* 245, 6097-6105 (1970).
- 120.- Levy, R., Levy, S., Rosenberg, S.A. and Simpson, R.T. "Selective stimulation of non histone chromatin protein synthesis in lymphoid cells by phytohemagglutinin". *Biochemistry* 12, 224-228 (1973).
- 121.- Johnson, E.M., Karn, J., Vidali, G. and Allfrey, V.G. "Early nuclear events in the induction of lymphocyte proliferation by mitogens. Effect of concanavalin A on the phosphorylation and distribution of non-histone chromatin proteins". *J. Biol. Chem.* 249, 4990-4999 (1974).
- 122.- Rovera, G. and Baserga, R. "Early changes in the synthesis of acidic nuclear proteins in human

- diploid fibroblasts stimulated to synthesize DNA by changing the medium". J. Cell Physiol. 77, 201-212 (1971).
- 123.- Zardi, L., Lin, J.C. and Baserga, R. "Immunospecificity to non-histone chromosomal proteins of antichromatin antibodies". Nature New Biol., 245, 211-213 (1973).
- 124.- Seale, R.L. and Aronson, A.I. "Chromatin associated proteins of the developing sea urchin embryo. I. Kinetics of synthesis and characterization of nonhistone proteins". J. Mol. Biol. 75, 633-646 (1973).
- 125.- LeSturgeon, W.M. and Rusch, H.P. "Nuclear acidic proteins changes during differentiation in Physarum polycephalum". Science 174, 1233-1236 (1971).
- 126.- LeSturgeon, W.M. and Rusch, H.P. "Localization nucleolar and chromatin residual acidic proteins changes during differentiation in Physarum polycephalum". Arch. Biochem. Biophys. 155, 144-158 (1973).
- 127.- Elgin, S.C.R. and Bonner, J. "Partial fractionation and chemical characterization of the major nonhistone chromosomal proteins". Biochemistry 11, 772-781 (1972).
- 128.- Arnold, E. and Young, K. "Isolation and partial electrophoretic characterization of total proteins from non sheared rat liver chromatin". Biochem. Biophys. Acta 257, 482-496 (1972).
- 129.- Pederson, T. "Gene activation in eukaryotes : are nuclear acidic proteins the cause of the effect?". Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 71, 617-621 (1974).

- 130.- LeStourgeon, W.M., Forer, A., Yang, Y.Z., Bertram, J.S. and Rusch, H.P. "Contractile proteins : major components of nuclear and chromosome non-histone proteins". Biochem. Biophys. Acta 379, 529-552 (1975).
- 131.- LeStourgeon, W.M., Totten, R. and Forer, A. "The nuclear acidic proteins in cell proliferation and differentiation. En Acidic proteins on the nucleus". Ed. I.L. Cameron, Acad. Press, N. York (1974).
- 132.- LeStourgeon, W.M. Comunicación personal (1976).
- 133.- Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C.B. "Affinity chromatography". Methods in Enzymology 22, 345-385 (1971).
- 134.- Hotta, Y. and Stern, H. "A protein which binds to single-stranded DNA in meiosis". J. Cell Biol. 47, 91a (1970).
- 135.- Hotta, Y. and Stern, H. "Meiotic protein in spermatocytes of mammals". Nature New Biol. 234, 83-86 (1971).
- 136.- Murakami, K. and Mano, Y. "Stimulation of sea urchin DNA polymerase by protein factors". Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 1125-1133 (1973).
- 137.- Lee, S.C. and Dahmus, M.E. "Stimulation of eukaryotic DNA-dependent RNA-polymerase by protein factors". Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 70, 1383-1387 (1973).
- 138.- Herrick, G. and Alberts, B. "A nucleic acid helix-unwinding protein from calf thymus". Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Expt. Biol. 32, 497 abs (1973).

- 139.- Banks, G.R. and Spanos, A. "The isolation and properties of a DNA-unwinding protein from Ustilago maydis". J. Mol. Biol. 93, 63-77 (1975).
- 140.- Salas, J. and Green, H. "Proteins binding to DNA and their relation to growth in cultured mammalian cells". Nature New Biol. 229, 165-169 (1971).
- 141.- Tsai, R.L. and Green, H. "Studies on a mammalian cell protein (P8) with affinity for DNA in vitro". J. Mol. Biol. 73, 307-316 (1973).
- 142.- Rubio, V., Tsai, W.P., Rand, K. and Long, C. "A comparison of DNA binding proteins from normal and virus-transformed mouse cells". Inter. J. Cancer, 12, 545-550 (1973).
- 143.- Melero, J.A., Salas, M.L., Salas, J. and MacPherson, I.A. "Deoxyribonucleic acid-binding proteins in virus-transformed cell lines". J. Biol. Chem. 250, 3683-3689 (1975).
- 144.- Perucho, M., Martin, C., Melero, J.A., Salas, J. and Salas, M.L. "A comparison of DNA-binding proteins in several types of cells in culture". Resultados no publicados.
- 145.- Fox, T.O. and Pardee, A.B. "Proteins made in the mammalian cell cycle". J. Biol. Chem. 246, 6159-6165 (1971).
- 146.- Stein, G.H. "DNA-binding proteins in young and senescent normal human fibroblasts". Expt. Cell Res. 90, 237-248 (1975).
- 147.- Diamonds, L. "Two spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo

- culture". Inter. J. Cancer 2, 143-152 (1967).
- 148.- Dulbecco, R. and Freeman, G. "Plaque production by the polyoma virus". Virology 8, 396-397 (1959).
- 149.- Litman, R.L. "A deoxyribonucleic acid polymerase from *M. Luteus* (*M. Lysodeikticus*) isolated on DNA-cellulose". J. Biol. Chem. 243, 6222-6233 (1968).
- 150.- Kalckar, H.M. "Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes". J. Biol. Chem. 167, 461-475 (1947).
- 151.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- 152.- Ornstein, L. "Disc electrophoresis I : background and theory". Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964).
- 153.- Davis, B.J. "Disc electrophoresis II : Method and application to human serum proteins". Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964).
- 154.- Shapiro, A.L., Viñuela, E. and Maizel, J.V. "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels". Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820 (1967).
- 155.- Reynolds, J.A. and Tanford, C. "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 66, 1002-1007 (1970).

- 156.- Weber, K. and osborn, M. "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis". J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).
- 157.- Liu, T.Y. and Chang, Y.H. "Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid". J. Biol. Chem. 246, 2842-2848 (1971).
- 158.- Lee, P.L.Y. "Single-column system for accelerated amino acid analysis of physiological fluids using five lithium buffers". Biochemical Medicine 10, 107-121 (1974).
- 159.- Karlsson, C., Davies, H., Ohman, J. and Anderson, U-B. "LKB 2117 multiphor. I. Analytical thin layer gel electrofocusing in polyacrylamide gel". Application note of LKB, 1-13 (1973).
- 160.- Vesterberg, O. "Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels". Biochim. Biophys. Acta 257 11-19 (1972).
- 161.- O'Farrell, P.H. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". J. Biol. Chem. 250, 4007-4021 (1975).
- 162.- Yphantis, D.A. "Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions". Biochemistry 3, 297-317 (1964).
- 163.- Cohn, E.J. and Edsall, J.T., eds. "Proteins, Amino Acids and Peptides". Reinhold Publishing Corp. New York (1948).
- 164.- Schachman, H.K. "Ultracentrifugation, Diffusion, and viscometry". Methods in Enzymology, vol IV, pg. 32-103 (1957).
- 165.- Keyser, J.W. "Staining of serum glycoproteins after electrophoretic separation in acrylamide gels". Anal. Biochem. 9, 249-252 (1964).

- 166.- Jones, O.W. and Berg, P. "Studies on the binding of RNA polymerase to polynucleotides". J. Mol. Biol. 22, 199-209 (1966).
- 167.- Legault-Demare, J., Desseaux, B., Heyman, T., Seror, S. and Ress, G.P. "Studies on hybrid molecules of nucleic acids. I. DNA-DNA hybrids on nitrocellulose filters". Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 550-557 (1967).
- 168.- Fishbein, W.N. "Quantitative densitometry of 1-50 µg protein in acrylamide gel slabs with Coomassie blue". Anal. Biochem. 46, 388-401 (1972).
- 169.- Fenner, C., Traut, R.R., Mason, D.T. and Wikman-Coffelt, J. "Quantification of Coomassie blue stained proteins in polyacrylamide gels based on analyses of eluted dye". Anal. Biochem. 63, 595-602 (1975).
- 170.- Marmur, J. "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms". J. Mol. Biol. 3, 208-218 (1961).
- 171.- Bray, G.A. "A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter". Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960).
- 172.- Edmonds, M. and Caramela, M.G. "The isolation and characterization of adenosine monophosphate-rich polynucleotides synthesized by Ehrlich Ascites cells". J. Biol. Chem. 244, 1314-1324 (1969).
- 173.- Cohen, S.N., Chang, A.Y., Boyer, H.W. and Helling, R.B. "Construction of biologically functional

- bacterial plasmids in vitro". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 70, 3240-3244 (1973).
- 174.- Ostlund, R. and Pastan, I. "Fibroblast tubulin". Biochemistry 14, 4064-4068 (1975).
- 175.- Borisy, G.G. and Taylor, E.W. "The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus". J. Cell Biol. 34, 525-548 (1967).
- 176.- Melero, J.A., Salas, M.L. and Salas, J. "Synthesis of a class of DNA-binding proteins in synchronized untransformed and virus-transformed cells". Eur. J. Biochem. (1976) En prensa.
- 177.- Peters, T.Jr. and Hawn, C. "Isolation of two large peptide fragments from the amino and carboxyl terminal positions of bovine serum albumin". J. Biol. Chem. 242, 1566-1573 (1967).
- 178.- Talavera, A. Comunicación personal.
- 179.- Inciarte, M.R., Lázaro, J.M., Salas, M. and Viñuela, E. "Physical map of bacteriophage Ø29 DNA". Virology (1976). En prensa.
- 180.- Hinkle, D.C. and Chamberlin, M.J. "Studies of the binding of Escherichia coli RNA. Polymerase to DNA". J. Mol. Biol. 70, 157-185 (1972).
- 181.- Mikoyan, V.S. and Zamchuk, L.A. "The use of membrane filters for characterisation of antibody-T-even phages DNA interaction" (Traducción del ruso). Mol. Biol. U.S.S.R. 7, 714-719 (1973).
- 182.- Lazarides, E. and Lindberg, U. "Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 71, 4742-4746 (1974).

- 183.- Wilson, L. and Bryan, J. "Biochemical and pharmacological properties of microtubules".
Adv. in Cell and Mol. Biol. 3, 21-72 (1974).
- 184.- Avila, J. and Gonzalez-Corces, V. Comunicación personal.
- 185.- Laemmli, U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227, 680-685 (1970).
- 186.- Villasante, A., "Caracterización de las fosfoproteínas con afinidad por el DNA aisladas de fibroblastos en cultivo". Trabajo de Licenciatura, Universidad Complutense, Madrid. Diciembre, 1975.
- 187.- Muirhead, H. and Perutz, M.F. "Structure of haemoglobin". Nature 199, 633-638 (1963).
- 188.- Bryan, J. "Biochemical properties of microtubules". Feder. Proceedings, 33, 152-157 (1974).
- 189.- D'Albis, A. and Gratzer, W. "Chemical cross-linking of myosin". J. Biol. Chem. 251, 2825-2830 (1976).
- 190.- Weber, A. and Murray, J.M. "Molecular control mechanisms in muscle contraction". Physiol. Rev. 53, 612-673 (1973).
- 191.- Melero, J.A., Salas, J. and Salas, M.L. "Subcellular distribution of DNA-binding proteins from cultured hamster fibroblasts". Biochim. Biophys. Acta (1986). En prensa.
- 192.- Rao, P.N. and Johnson, R.T. "Induction of chromosome condensation in interphase cells". Adv. in Cell and Molecular Biol. 3, 135-189 (1974).

- 193.- Samarina, O.P., Krichevskaya, A.A. and Georgiev, G.P. "Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acids". *Nature* 210, 1319-1322 (1966).
- 194.- Pederson, T. "Proteins associated with heterogeneous nuclear RNA in eukariotic cells". *J. Mol. Biol.* 83, 163-184 (1974).
- 195.- Georgiev, G.P. "Precursor of mRNA (Pre-mRNA) and ribonucleoprotein particles containing pre-mRNA." In the *Cell Nucleus*, vol III. Busch, H. ed. Academic Press. pp 67-108. (1974).
- 196.- Lebleu, B., Marbaix, G., Huez, G., Temmerman, J., Burny, A. and Chantrenne, H. "Characterization of the messenger ribonucleoprotein released from reticulocyte polysomes by EDTA treatment". *Eur. J. Biochem.* 19, 264-269 (1971).
- 197.- Blobel, G. "A protein of molecular weight 78.000 bound to a polyadenylate region of eukaryotic messenger RNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 924-928 (1973).
- 198.- Spirin, A.S. "Non ribosomal RNP particles (inframosomes) of animal cells". Bosch, L. ed. "The Mechanism of protein synthesis and its regulation". North Holland, Amsterdam, pp 515-538 (1972).
- 199.- Schweiger, A. and Hannig, K. "Studies on the RNA-binding activity of rat liver cytosol". *Biochim. Biophys. Acta* 254, 255-264 (1971).
- 200.- Stepanov, A.S., Voronina, A.S., Ovchinnikov, L.P. and Spirin, A.S. "RNA-binding protein factor of animal cell extracts" *FEBS Letters* 18, 13-18. (1971).

201.- Schweiger, A. and Spitzaver, P. "Identification and partial characterization of a rat liver cytosol protein with high affinity to RNA and DNA". Biochim. Biophys. Acta 277, 403-412 (1972).